

Überdauerung des insektiziden Proteins Cry1Ab in Böden auf Anbauflächen mit gentechnisch verändertem MON810-BT-Mais

Von der
Fakultät Architektur, Bauingenieurwesen und Umweltwissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigte

Dissertation

von
Petra Valldor (geb. Möbus)
geboren am 10.03.1977
aus Zittau

Eingereicht am: 06. Oktober 2014

Disputation am: 18. Februar 2015

Berichterstatter: Prof. Dr. Christoph Tebbe
Prof. Dr. Robert Kreuzig
Prof. Dr. Rolf Nieder

„Der Beginn aller Wissenschaften ist das Erstaunen, dass die Dinge so sind, wie sie sind.“
Aristoteles (384 - 322 v. Chr.)

Kurzfassung

Seit den 90er Jahren werden gentechnisch veränderte Pflanzen mit steigender Tendenz weltweit in der Landwirtschaft genutzt. Eine der ersten und bis heute angebauten Pflanzen ist der BT-Mais MON810, der durch die Expression des insektiziden Proteins Cry1Ab resistent gegenüber wichtigen Maisschädlingen, insbesondere dem Maiszünsler (*Ostrinia nubilalis*, *Lepidoptera*) ist. Obschon auch in Europa die Pflanze durch die EU für den Anbau inzwischen offiziell zugelassen wurde, ist ihre landwirtschaftliche Nutzung nach wie vor umstritten. Die Bedenken umfassen, neben möglichen sozioökonomischen Auswirkungen auch Unsicherheiten bezüglich Wirkungen auf Nichtzielorganismen und die Überdauerung des Cry1Ab-Proteins in der Umwelt, insbesondere in landwirtschaftlichen Böden. Bisherige Studien zum Verbleib des Cry1Ab-Proteins auf Maisfeldern mit MON810 wurden nur an einzelnen Versuchsflächen mit divergierenden Standorteigenschaften durchgeführt. Dadurch war eine Übertragung der Erkenntnisse auf andere Standorte und eine Ableitung allgemein gültiger Vorhersagen, insbesondere zum Einfluss der Adsorption auf den biologischen Abbau des Cry1Ab im Boden bisher nicht möglich. In der vorliegenden Dissertationsarbeit wurde deshalb der Verbleib des Cry1Ab im Boden unter realen landwirtschaftlichen Bedingungen an 15 unterschiedlichen Standorten im Nordosten Deutschlands untersucht und verglichen. Die Ergebnisse der Analysen belegten, dass der Haupteintrag des Cry1Ab-Proteins in den Boden erst nach der Ernte durch auf dem Feld verbliebene Maispflanzenreste erfolgte. Ein Großteil des Cry1Ab zersetzte sich bereits direkt nach der Ernte noch im Pflanzenmaterial, also bevor die Proteine an die Bodenmatrix gelangten. Im Boden selber wurden nur sehr niedrige Konzentrationen von 0,02 bis 0,26 ng g⁻¹ nachgewiesen. Die Cry1Ab-Werte von den verschiedenen Standorten zeigten eine deutliche Abhängigkeit zu bestimmten Bodeneigenschaften, insbesondere dem Ton- und Sandgehalt, was den Einfluss von Adsorptionsprozessen vermuten ließ. Um die Bedeutung der Adsorption in Böden für die Überdauerung von Cry1Ab Proteinen besser zu verstehen, wurden im Rahmen dieser Arbeit deshalb zusätzlich Laboruntersuchungen mit ¹⁴C-markiertem Cry1Ab Protein durchgeführt und der Abbau dieser Verbindung anhand von ¹⁴C-Massenbilanzen verfolgt. Dafür musste zunächst Cry1Ab mit ¹⁴C markiert werden, da diese Verbindung kommerziell nicht erhältlich war. Die ¹⁴C-Markierung erfolgte mit Hilfe eines gentechnisch veränderten *E. coli*-Stamms über die Zugabe von ¹⁴C-Glycerin als Kohlenstoffquelle und ¹⁴C-Leucin als essentieller Aminosäure zum Kulturmedium. Um eine effektive ¹⁴C-Markierung des Cry1Ab zu erreichen, musste das optimale Verhältnis von markiertem und nicht markiertem Kohlenstoff im Nährmedium ermittelt und angepasst werden. Schließlich gelang es ¹⁴C-Cry1Ab mit spezifischen Aktivitäten von 8.000 – 36.000 dpm mg⁻¹ herzustellen, dass sich für die geplante Untersuchung des Abbaus im Boden eignete. Der Abbau wurde in zwei unterschiedlichen Böden (Sand und toniger Lehm) verfolgt. Die Ergebnisse der aufgestellten ¹⁴C-Massenbilanzen bewiesen, dass ein Teil des Cry1Ab nach der Zugabe im Boden sofort adsorbiert wurde, der Cry1Ab-Anteil in der flüssigen Phase des Bodens jedoch einem äußerst schnellen biologischen Abbau unterlag. Die kontinuierliche ¹⁴CO₂-Freisetzung über 100 Tage zeigte zudem, dass auch der adsorbierte Anteil des Cry1Ab nach und nach wieder freigesetzt und letztendlich ebenfalls mineralisiert wurde. Zusätzlich durchgeführte PCR-SSCP-Analysen belegten, dass bei den im Freiland maximal erreichbaren Cry1Ab-Konzentrationen keine Veränderungen in der Bodenmikroorganismengemeinschaft zu erwarten sind. Schlussfolgernd ließ sich ableiten, dass die Desorptionsrate des Bodens den limitierenden Faktor für die Mineralisation des Cry1Ab-Protein darstellte. Bisherige Untersuchungsergebnisse, die anhand extraktionsbasierter Nachweisverfahren gewonnen wurden, sollten in Abhängigkeit von den Bodeneigenschaften der untersuchten Standorte deshalb neu bewertet werden.

Abstract

Worldwide genetically engineered plants are used agriculturally since more than 20 years with a tendency to rise. One of the first and up to date used plants is BT-maize MON810 expressing the insecticide protein Cry1Ab, which causes resistance against his main pests, particularly the European corn borer. While in EU the agricultural use of MON810 is authorized, the cultivation is still highly controversial. The concerns are – beside of possible socio-economic effects – uncertainties about possible effects on nontarget organisms and the persistence of Cry1Ab in the environment, especially in soil from fields cultivated with MON810. Previous field studies to the fate of Cry1Ab in the soil were conducted only on isolated fields with different site characteristics. Hence, so far a generalization of the results for the assessment of other sites, especially for the effect of the adsorption on the degradation of the Cry1Ab in soil is lacking. The aims of this thesis are to analyze the degradation of Cry1Ab in soil under real agricultural conditions and to place the findings in a broader perspective. Fifteen field sites in Germany, cultivated with MON810-BT-maize, were monitored during and after the cultivation period. The results prove that the main Cry1Ab-input into the soil occurs after the harvest by remaining maize plant residues. In this process the main part of the Cry1Ab dissipated already during the degradation of the plant before reaching the soil. Detected Cry1Ab-levels in soil ranged between 0.02 to 0.26 ng g⁻¹. The Cry1Ab-concentrations showed a clear correlation to soil properties, mainly clay and sand content, caused from adsorption processes. For a better understanding of the effect of adsorption on the degradation of Cry1Ab in soil laboratory tests with ¹⁴C-labeled Cry1Ab were conducted and the degradation of ¹⁴C-Cry1Ab was analyzed with ¹⁴C-mass balances. Therefor the Cry1Ab had to be labeled with ¹⁴C, because the composition isn't commercial available. The ¹⁴C-labeling was performed with the genetically engineered E. coli-strain HB101 pMP by the addition of ¹⁴C-Glycerine and ¹⁴C-Leucine to the nutrient solution. For an effective labeling the ratio between labeled and unlabeled C in the nutrient solution had to be adjusted. Finally ¹⁴C-Cry1Ab batches with specific activities of 8,000 – 36,000 dpm mg⁻¹, which sufficed for the intended degradation study, were obtained. The degradation of ¹⁴C-Cry1Ab was analyzed in two different soils (loam and sand). The results of the ¹⁴C-mass balances prove that one fraction of the Cry1Ab was instantly biologically degraded in the liquid phase of the soil, while the rest was adsorbed. Furthermore the continuous ¹⁴CO₂ production over 100 days showed that the adsorbed protein was gradually released and biologically degraded. In addition, the PCR-SSCP-analysis verified that the largest expectancy value of the Cry1Ab concentration in field soil has no effects on the bacterial communities. Finally the results show, that the desorption rate represents the limiting factor for the Cry1Ab degradation in soil. Thus, results of previous studies, derived from extraction-based tests, will have to be re-evaluated with regard to the site-specific soil properties.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	15
2	ZIELE DER DISSERTATION	19
3	FREILANDMONITORING	21
3.1	EINLEITUNG	21
3.2	MATERIAL UND METHODEN	23
3.2.1	STANDORTE	23
3.2.2	PROBENAHMEN AN DEN FREILANDSTANDORTEN	24
3.2.3	EXTRAKTION UND NACHWEIS VON CRY1AB-PROTEINEN AUS BODEN- UND PFLANZENMATERIAL	27
3.2.3.1	Abschätzung des Detektionslimits für die Cry1Ab-Quantifizierung	27
3.2.3.2	Ermittlung der Extraktionseffizienz	28
3.2.3.3	Analysen aus wurzelfreiem Boden	28
3.2.3.4	Analysen aus Rhizosphäre-Material	29
3.2.3.5	Analysen aus Maiswurzeln	29
3.2.4	BERECHNUNG DER CRY1AB-EINTRAGSMENGEN IN FREILANDBODEN	29
3.2.5	BESTIMMUNG PHYSIKOCHEMISCHER UND BIOLOGISCHER BODENEIGENSCHAFTEN	30
3.2.5.1	Ermittlung des pH-Wertes	30
3.2.5.2	Korngrößenanalyse	30
3.2.5.3	Ermittlung des Kohlenstoff- und Stickstoffgehaltes	31
3.2.5.4	Ermittlung des Biomasse-Kohlenstoffgehaltes	31
3.2.5.5	Ermittlung der Kationenaustauschkapazität	31
3.2.5.6	Ermittlung der maximalen Wasserhaltekapazität	32
3.2.6	STATISTISCHE AUSWERTUNGEN	32
3.3	ERGEBNISSE	34
3.3.1	BESTIMMUNG DER EXTRAKTIONSEFFIZIENZ FÜR DIE CRY1AB-QUANTIFIZIERUNGEN	34
3.3.2	STATISTISCHES DETEKTIONSLIMIT FÜR DIE CRY1AB-QUANTIFIZIERUNGEN	35
3.3.3	CRY1AB-GEHALTE IN BODEN UND PFLANZEN	35
3.3.3.1	Cry1Ab-Gehalt im wurzelfreien Boden	36
3.3.3.2	Cry1Ab-Gehalt im Rhizosphärenboden	37
3.3.3.3	Cry1Ab-Gehalt in den Maiswurzeln	39
3.3.3.4	Cry1Ab-Gehalt im wurzelfreien Boden aus unterschiedlichen Bodentiefen	41
3.3.3.5	Überdauerung von Cry1Ab-Gehalten im Freilandboden	42
3.3.3.6	Abschätzung der Cry1Ab-Gesamteintragsmengen in den Freilandboden	43
3.3.4	PHYSIKOCHEMISCHE BODENEIGENSCHAFTEN	43
3.3.5	KORRELATION ZWISCHEN CRY1AB-GEHALTEN IN DEN RHIZOSPHÄRENBÖDEN UND DEN PHYSIKOCHEMISCHEN BODENPARAMETERN	47
3.3.6	KORRELATION ZWISCHEN DEN CRY1AB-GEHALTEN IM WURZELFREIEN BODEN UND PHYSIKOCHEMISCHEN BODENPARAMETERN	49

3.4 DISKUSSION	51
3.4.1 CRY1AB-GEHALTE IN PFLANZEN UND BODEN IM FREILAND	52
3.4.2 PERSISTENZ UND ABBAU DES CRY1AB-PROTEINS IM FREILAND	55
3.4.3 AKKUMULATION DES CRY1AB IM FREILANDBODEN?	57
3.4.4 VERTIKALE VERLAGERUNG DES CRY1AB-PROTEINS IM FREILANDBODEN	58
3.4.5 TOXIKOLOGISCHE BEWERTUNG	59
3.4.6 ZUSAMMENHANG ZWISCHEN CRY1AB-GEHALTEN IM BODEN UND PHYSIKOCHEMISCHEN SOWIE BIOLOGISCHEN BODENPARAMETERN	59
3.4.7 FAZIT	62
4 HERSTELLUNG VON ¹⁴C-CRY1AB *	63
4.1 EINLEITUNG	63
4.2 MATERIAL UND METHODEN	64
4.2.1 HERSTELLUNG DES ¹⁴ C-CRY1AB MIT HILFE EINES REKOMBINANTEN <i>ESCHERICHIA COLI</i> STAMMES	64
4.2.1.1 Beschreibung des Produktionsstammes	64
4.2.1.2 Kultivierung des Produktionsstammes	64
4.2.1.2.1 Vorkultur	64
4.2.1.2.2 Auswahl des Hauptkulturmediums	65
4.2.1.2.3 Produktionsbedingungen von ¹⁴ C-Cry1Ab (Hauptkultur)	67
4.2.1.3 Lysis der Zellen	68
4.2.1.4 Reinigung der Cry1Ab-Einschlusskörper	69
4.2.1.5 Überführung des Cry1Ab in die lösliche Phase (Solubilisierung)	69
4.2.1.6 Reinigung des Cry1Ab-Protoxins durch Ultrafiltration	69
4.2.1.7 Trypsinisierung des Protoxins	70
4.2.1.8 Reinigung des Toxins durch Ultrafiltration	70
4.2.1.9 Lagerung des ¹⁴ C-Cry1Ab-Proteins	71
4.2.2 MESSUNG DER AKTIVITÄT DES ¹⁴ C-CRY1AB	71
4.2.3 SDS-POLYACRYLAMIDGELEKTROPHORESE	71
4.2.3.1 Herstellung der SDS-Gele	71
4.2.3.2 Elektrophorese	72
4.2.3.3 Färbung der Gele	72
4.2.4 ABSCHÄTZUNG DER REINHEIT DES HERGESTELLTEN ¹⁴ C-CRY1AB	73
4.3 ERGEBNISSE	74
4.3.1 LIMITIERUNG DER KOHLENSTOFFQUELLEN	74
4.3.1.1 Anpassung der Kultivierungsmethode zur Produktion von ¹⁴ C-Cry1Ab	74
4.3.1.2 Reduzierung der Kohlenstoffquelle im Medium	78
4.3.2 ¹⁴ C-MARKIERUNG DES CRY1AB	79
4.3.2.1 ¹⁴ C-Massenbilanzen	80
4.3.2.2 Bewertung des ¹⁴ C-Cry1Ab mit SDS PAGE	82

* Die Ergebnisse dieses Kapitels wurden publiziert: Valldor *et al.*, 2012

4.3.2.3 Beobachtete Auswirkungen der radioaktiven Strahlung auf die Zellmorphologie und die Ausbildung von Proteineinschlusskörpern	83
4.3.2.4 Reinheit des ^{14}C -Cry1Ab	83
4.4 DISKUSSION	85
5 ABBAU VON CRY1AB IM BODEN	89
5.1 EINLEITUNG	89
5.2 MATERIAL UND METHODEN	90
5.2.1 BÖDEN	90
5.2.2 UNTERSUCHUNG DES ^{14}C -CRY1AB-ABBAUS IM BODEN	91
5.2.2.1 Zugabe des ^{14}C -Cry1Ab in den Boden	91
5.2.2.2 Versuchsaufbau	92
5.2.3 MESSUNG DER ^{14}C -AKTIVITÄT	93
5.2.4 ^{14}C -BESTIMMUNG IN VERSCHIEDENEN BODENFRAKTIONEN	94
5.2.4.1 ^{14}C -Biomassebestimmung nach der CFI-Methode	94
5.2.4.2 Ermittlung der bioverfügbaren ^{14}C -Fraktion im Boden	95
5.2.4.3 Verbrennung der Bodenfraktion	95
5.2.5 UNTERSUCHUNG DER BAKTERIENVIELFALT IN DEN INKUBIERTEN BODENPROBEN MIT DER PCR-SSCP-METHODE	95
5.3 ERGEBNISSE	97
5.3.1 VERFOLGUNG DES ^{14}C -CRY1AB-ABBAUS IM BODEN	97
5.3.1.1 CO_2 -Freisetzung während des Abbaus	97
5.3.1.2 Bilanzierung der Cry1Ab-Anteile in freigesetztem CO_2 , Biomasse und Boden	99
5.3.1.3 Bioverfügbare ^{14}C -Cry1Ab-Anteil im Boden	100
5.3.2 QUANTIFIZIERUNG DES CRY1AB MIT ELISA	102
5.3.3 UNTERSUCHUNG DES GENETISCHEN PROFILS DER BODENMIKROORGANISMEN	103
5.4 DISKUSSION	106
5.4.1 ABBAU DES CRY1AB IM BODEN	106
5.4.2 ADSORPTION DES CRY1AB IM BODEN	108
5.4.3 AUSWIRKUNG DES CRY1AB-ABBAUS AUF DIE BODENMIKROORGANISMENGEMEINSCHAFT	110
6 FAZIT	113
7 ZUSAMMENFASSUNG	115
8 SUMMARY	117
9 LITERATUR	119
10 ANHANG	133
DANKSAGUNG	141

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Übersichtsskizze zur Festlegung der Probenahmepunkte auf den Untersuchungsflächen ---	26
Abbildung 2:	Wiederfindung des dem Boden zugesetzten reinen Cry1Ab -----	34
Abbildung 3:	Cry1Ab-Gehalte im wurzelfreien Boden in den Jahren 2005 - 2007 während der Maisblüte und 4 - 6 Wochen nach der Ernte-----	36
Abbildung 4:	Cry1Ab-Gehalte im Rhizosphärenboden der untersuchten Freilandstandorte zur Maisblüte sowie 4 - 6 Wochen nach der Ernte in den Jahren 2005 – 2007-----	38
Abbildung 5:	Cry1Ab-Gehalte in Maiswurzeln zur Maisblüte sowie 4 - 6 Wochen nach der Ernte in den Jahren 2005 - 2006 auf den untersuchten Freilandstandorten -----	39
Abbildung 6:	Cry1Ab-Gehalt in Wurzelresten von den Freilandstandorten F1, F4, F3 ⁽⁰⁵⁾ und F5 ⁽⁰⁵⁾ sechs Monate sowie zwölf bzw. sechzehn Monate nach der Ernte -----	40
Abbildung 7:	Cry1Ab-Gehalt im wurzelfreien Boden in verschiedenen Bodentiefen-----	41
Abbildung 8:	Cry1Ab-Gehalt im wurzelfreien Boden im Zeitraum von der Maisblüte bis 15 Monate nach der Ernte-----	42
Abbildung 9:	Graphische Darstellung der physikochemischen Bodenparameter der Böden an den Freilandstandorten F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7, F8, F9, F10, F11; gemessen zur Maisblüte ----	45
Abbildung 10:	Korrelationen zwischen Cry1Ab-Gehalt im Rhizosphärenboden und physikochemischen Bodenparametern -----	48
Abbildung 11:	Korrelationen zwischen Cry1Ab-Gehalt im wurzelfreien Boden und physikochemischen Bodenparametern -----	50
Abbildung 12:	Versuchsanordnung zur Kultivierung von <i>E. coli</i> HB101 pMP in Gegenwart von ¹⁴ C-Glycerin und ¹⁴ C-Leucin für die Biosynthese von ¹⁴ C- Cry1Ab-----	67
Abbildung 13:	Schematische Übersicht zur Vorgehensweise bei der grafischen Ermittlung der Reinheit des hergestellten ¹⁴ C-Cry1Ab aus einer SDS-Gelgrafik -----	73
Abbildung 14:	SDS-Gel mit Cry1Ab-Protoxinbanden (Reihe 2-5) und Cry1Ab-Toxinbanden (Reihe 6-9) der Cry1Ab-Produktion zum Vergleich der Reinheit und Ausbeute des Cry1Ab aus <i>E. coli</i> -Kulturanisätzen (200 ml) mit vier verschiedenen Medien. -----	75
Abbildung 15:	Lichtmikroskopische Aufnahme von <i>E. coli</i> Zellen mit Proteineinschlusskörpern; hier aus der Vorkultur nach 3-tägigem Wachstum -----	77
Abbildung 16:	Abbildung der <i>E. coli</i> -Zellen nach 4-tägigem Wachstum in Hauptkultur (A) und Vorkultur (B) bei gleicher Vergrößerung -----	77
Abbildung 17:	SDS-Gel mit Cry1Ab-Banden zum Vergleich der Cry1Ab-Qualität nach unterschiedlicher Kohlenstoffzugabe im Medium -----	78
Abbildung 18:	SDS-Gele von ¹⁴ C-Cry1Ab-Protoxin und Toxin aus allen Produktionsansätzen -----	82
Abbildung 19:	Auftragung der Pixelintensitäten über dem Molekulargewicht zur graphischen Abschätzung der Reinheit des ¹⁴ C-Cry1Ab in Gew.- % -----	84
Abbildung 20:	Schematische Übersichtsskizze zum Versuchsaufbau der ¹⁴ C-Cry1Ab Abbauversuche -----	92
Abbildung 21:	Abbildung des Versuchsaufbaus für die Untersuchung des Cry1Ab-Abbaus im Labor -----	93
Abbildung 22:	Abbildung des Versuchsaufbaus zur Biomassebestimmung nach der CFI-Methode-----	94
Abbildung 23:	Summenkurven des als CO ₂ freigesetzten ¹⁴ C-Anteils der zugegebenen Gesamtaktivität (10.000 dpm) während des Abbaus über eine Dauer von 29 -----	98
Abbildung 24:	Prozentuale ¹⁴ C-Anteile an zugegebener Gesamtaktivität (100 % entsprechen 10.000 dpm), gemessen nach einmonatigem Abbau, in CO ₂ , in der Biomasse und im Boden in Ansatz A und B, dargestellt als Stapelbalkengrafik -----	99

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 25: Aus dem Boden extrahiertes ^{14}C nach einmonatigem Abbau, angegeben als prozentualer Anteil an der zugebenen Gesamtaktivität für Ansatz A und B.	101
Abbildung 26: ELISA-Quantifizierung des Cry1Abs im PBST-Extrakt	103
Abbildung 27: Cluster-Analyse der SSCP-Profile der Böden von Ansatz A.....	104
Abbildung 28: Cluster-Analyse der SSCP-Profile der Böden von Ansatz B.....	105

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Übersicht zu Bodenart, Bodenklasse, mittlerem Jahresniederschlag und mittlerer Jahrestemperatur sowie die topographische Einordnung der Untersuchungsstandorte -----	23
Tabelle 2:	Übersicht über die Probenahmeflächen, Probenbezeichnung, angebaute Maissorte, Anbauzeitraum, Maisnutzung sowie Art der Proben -----	25
Tabelle 3:	Parameter zur Abschätzung des Cry1Ab-Eintrages in den Freilandboden sowie die sich ergebenden maximalen Cry1Ab-Eintragsmengen, abhängig von der Maisnutzung -----	43
Tabelle 4:	Bodenarten der Untersuchungsstandorte -----	46
Tabelle 5:	Zusammensetzung des Vorkulturmediums -----	65
Tabelle 6:	Zusammensetzung des 10 x TB-Salzes für das Vorkulturmedium -----	65
Tabelle 7:	Zusammensetzung der getesteten Hauptkulturmedien zur ¹⁴ C-Cry1Ab-Produktion für Ansatz 1 bis Ansatz 4 -----	66
Tabelle 8:	Zusammensetzung des 10 x Salzes bei Ansatz 1 bis 3 -----	66
Tabelle 9:	Zusammensetzung des 10 x M9 Salzes bei Ansatz 4 -----	66
Tabelle 10:	Zusammensetzung der Spurenelemente für Ansatz 1 bis 4 -----	66
Tabelle 11:	Zusammensetzung der Vitamine für Ansatz 1 und 3 -----	67
Tabelle 12:	Zusammensetzung von Trenngel und Sammelgel für die SDS-PAGE-Analyse -----	71
Tabelle 13:	Quantifizierte Cry1Ab-Protoxin- und Cry1Ab-Toxinmengen zum Vergleich der Cry1Ab-Ausbeute aus 200 ml <i>E. coli</i> -Kulturansätzen mit vier verschiedenen Medien -----	76
Tabelle 14:	Zum Medium zugegebene Kohlenstoffmengen sowie die resultierenden Cry1Ab-Mengen, quantifiziert mit <i>BCA-Protein-Assay-Kit</i> , angegeben mit Standardabweichung -----	79
Tabelle 15:	¹⁴ C-Massenbilanzen zur Ermittlung der Wiederauffindungsraten im Zusammenhang mit der Synthese von ¹⁴ C-Cry1Ab durch den rekombinanten <i>E. coli</i> -Stamm HB101pMP aus verschiedenen 200 ml Kultivierungsansätzen -----	81
Tabelle 16:	Charakteristische Bodenparameter der ausgewählten Böden -----	90
Tabelle 17:	Gesamtmenge sowie spezifische Aktivität des zu dem Sandboden und Lehm Boden zugegebenen ¹⁴ C-Cry1Ab -----	91
Tabelle 18:	¹⁴ C-Massenbilanzen für Ansatz A und B über adsorbiertes ¹⁴ C im Boden, bioverfügbare ¹⁴ C-Fraktion als PBST-Extrakt sowie als CO ₂ freigesetztes ¹⁴ C, angegeben als prozentuale Anteile an zugegebener Gesamtaktivität. -----	102

Abkürzungen

<i>g</i>	Erdbeschleunigung (9,81 m s ⁻²)
v/v	<i>volume per volume</i> (Volumen pro Volumen)
w/w	<i>weight per weight</i> (Gewicht pro Gewicht)
w/v	<i>weight per volume</i> (Gewicht pro Volumen)
APS	Ammoniumpersulfat
BBA	Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft
BBCH65	Bezeichnung für Entwicklungsstadium der Maispflanze
BCA	Bicinchoninsäure
BK 50	Bodengeologische Basiskarten 1:50.000
BT	<i>Bacillus thuringiensis</i>
CAPS	Cyclohexylaminopropansulfonsäure
CEC	<i>Cation Exchange Capacity</i> (Kationenaustauschkapazität)
CFE	Chloroform-Fumigation-Extraktion
CFI	Chloroform-Fumigation-Inkubation
Cry1Ab	spezifische Bezeichnung für ein Kristallprotein aus <i>Bacillus thuringiensis</i>
Cry1Ac	spezifische Bezeichnung für ein Kristallprotein aus <i>Bacillus thuringiensis</i>
DAS-ELISA	<i>Double Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DIN	Deutsches Institut für Normung
DLR	Dienstleistungszentrum ländlicher Raum
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase I	Desoxyribonuklease I
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EFSA	Europäische Lebensmittelsicherheitsbehörde
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EU	Europäische Union
F~	Feldbezeichnung
FW	Feuchtgewicht
GMO	gentechnisch veränderte Organismen (<i>genetical modified organisms</i>)
GPS	<i>Global Positioning System</i>
HB101	Bezeichnung für kommerziell erhältlichen <i>E. coli</i> -Stamm
IOBC	<i>International Organisation for Biological and Integrated Control</i>
ISO	Internationale Organisation für Normung
KAK	Kationenaustauschkapazität
KAK _{eff}	effektive Kationenaustauschkapazität
KAK _{pot}	potentielle Kationenaustauschkapazität
Korr.	Korrelationskoeffizient
LUFA	Landwirtschaftliche Untersuchungs- und Forschungsanstalt
MON810	BT-Maislinienbezeichnung der Firma Monsanto
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (phosphatgepufferte Salzlösung)
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
TB	<i>Terrific Broth Medium</i>

Abkürzungen (Fortsetzung)

TEMED	(N,N,N',N', Tetramethylethylenamin)
TG	Trockengewicht
USA	<i>United States of America</i>
WPRS	<i>West Palaearctic Region Section</i>

1 Einleitung

Mais ist eine der wichtigsten landwirtschaftlichen Kulturpflanzen weltweit. Im Jahr 2012 wurde Mais insgesamt auf einer Fläche von 155 Millionen Hektar angebaut (Transgen, 2013 (URL)). Neben der direkten Nutzung als Nahrungsmittel und Tierfutter dient Mais auch in Form von Stärke als Lebensmittelzusatzstoff und wird außerdem für technische Anwendungen in großem Umfang genutzt (Türk, 2014; Scott & Pollack, 2005). Aufgrund seiner starken Biomassenentwicklung kann Mais große Nährstoffmengen aufnehmen (z.B. aus Tierfäkalien, die bei Massentierhaltung entstehen) und als Energielieferant für die landwirtschaftliche Biogasproduktion CO₂-neutral genutzt werden. Hierdurch hat der Maisanbau, auch unter Monokulturbedingungen, in Deutschland extrem zugenommen. Der jahrzehntelange intensive landwirtschaftliche Maisanbau führte jedoch in manchen Regionen Europas, darunter auch in Teilen Süd- und Ostdeutschlands, bereits zu einer raschen Ausbreitung von Schädlingsekten (Altieri *et al.*, 1978). Als Hauptschädling ist der Maiszünsler (*Ostrinia nubilalis*, *Lepidoptera*) zu nennen, der Ernteverluste bis zu 20 % verursachen kann (Degenhardt *et al.*, 2003). Die Bekämpfung des Maiszünslers kann mechanisch, chemisch oder auch biologisch erfolgen. Gemeinsam zeichnen sich diese Methoden jedoch durch einen hohen Arbeitsaufwand und häufig nur geringe Effizienz aus (Hommel *et al.*, 2006; Degenhardt *et al.*, 2003). Deshalb wird in vielen Fällen auf eine aktive Bekämpfung des Maiszünslers komplett verzichtet und die damit einhergehenden Ernteverluste in Kauf genommen (BioSicherheit, 2011 (URL)). Diese Option birgt allerdings das Risiko, dass aufgrund eines Befalls mit dem Pilz *Fusarium* das Erntegut mit Mycotoxinen befallen und damit für die Nutzung als Lebens- und Futtermittel unbrauchbar wird (Bowers *et al.*, 2014).

Durch die Entdeckung der insektiziden Eigenschaften des grampositiven, sporenbildenden Bakteriums *Bacillus thuringiensis* (im Folgenden „BT“) Anfang des 20. Jh. eröffneten sich neue Möglichkeiten zur Schädlingsbekämpfung (Ishwata, 1901; Berliner, 1915; Worthington, 1991; Knowles, 1994). Das Bakterium produziert während seiner Sporulation einen parasporalen Proteinkristall, der aus dem sogenannten δ -Endotoxin besteht. δ -Endotoxine, die von unterschiedlichen BT-Stämmen gebildet werden können, zeichnen sich durch eine hochspezifische Wirkung gegen Schädlingsekten aus (Höfte & Whiteley, 1989; Crickmore *et al.*, 1998; Schnepf *et al.*, 1998). Dabei handelt es sich um Protoxine, die nach der Aufnahme erst im Darmtrakt der Insekten durch Spaltung (Proteolysis) aktiv werden. Die δ -Endotoxine wurden 1989 von Höfte und Whiteley auf

Grund ihrer Wirkungsspezifität gegen Pterygota (Fluginsekten) und ihrer strukturellen Eigenschaften in fünf Hauptklassen eingeteilt: CryI wirkt spezifisch gegen Lepidopteren (Schmetterlinge), CryII gegen Lepidopteren und Dipteren (Zweiflügler), CryIII gegen Coleopteren (Käfer), CryIV gegen Dipteren und CryV gegen Coleopteren und Lepidopteren. Diese Hauptklassen sind in weitere Unterklassen eingeteilt, die durch entsprechende Großbuchstaben gekennzeichnet wurden. Aufgrund der Vielzahl neu entdeckter δ -Endotoxine wurde 1998 von Crickmore *et al.* eine neue Nomenklatur eingeführt, die nur noch auf der Sequenzhomologie der Toxine beruht und stammbaumartig aufgebaut ist. Die Bezeichnungen der bis dahin entdeckten Toxine wurden beibehalten, die römischen Ziffern wurden jedoch durch lateinische Zahlen ausgetauscht. Beim spezifisch gegen den Maiszünsler wirksamen δ -Endotoxin des gentechnisch veränderten BT-Mais MON810 handelt es sich beispielsweise um das Protein Cry1Ab (Mendelsohn *et al.*, 2003), also einem Protein, das gegen Lepidopteren wirkt.

Erste Versuche zur Schädlingsbekämpfung mit *Bacillus thuringiensis* wurden in den späten zwanziger Jahren des zwanzigsten Jahrhunderts durchgeführt (Knowles, 1994). Seit den sechziger Jahren wurden BT-Präparate in Land- und Forstwirtschaft vor allem als Sprays großflächig angewandt (Tapp *et al.*, 1994; Crecchio & Stotzky, 1998; Vettori *et al.*, 2003). Mit der Entwicklung gentechnisch veränderter Pflanzen in den achtziger Jahren wurden Gensequenzen, die für die Synthese von Cry-Proteinen kodieren, in das Erbgut verschiedener Nutzpflanzen, unter anderem auch Mais, eingebaut (Scott & Pollack, 2005). Das Cry1Ab Protein von MON810 wird dabei z.B. in allen Pflanzenteilen gebildet. Dadurch wird die Pflanze selbst toxisch für den Schädling, nicht jedoch für Insekten, die nicht an den Pflanzen fressen. Der Einsatz chemischer Pestizide und anderer Bekämpfungsmethoden sollte bei MON810 deshalb nicht mehr notwendig sein und direkte Wirkungen auf andere Insekten wären damit ausgeschlossen.

Mitte der neunziger Jahre begann die kommerzielle Nutzung von gentechnisch verändertem BT-Mais in den USA (Mendelsohn *et al.*, 2003). Im Jahr 2012 erreichte der Anbau dort eine Fläche von etwa 34 Millionen Hektar (Transgen, 2013 (URL)). In der EU wurde BT-Mais (MON810) im Jahr 1998 zunächst zugelassen. Nach Frankreich, Österreich und einigen anderen Ländern hat auch Deutschland 2009 den BT-Maisanbau auf Grund von nationalen Notfallklauseln wieder verboten, bei denen unter anderem auf Unsicherheiten in der Beeinträchtigung von Nichtzielorganismen auch über den Boden verwiesen wurde. Davon unberührt wird weltweit BT-Mais mittlerweile auf einer Fläche von etwa 57 Millionen Hektar, was mehr als dem dreifachen der gesamten landwirtschaftlichen Fläche Deutschlands entspricht, angebaut (Transgen, 2014 (URL)). BT-Mais gehört damit zu den

am häufigsten angepflanzten gentechnisch veränderten Pflanzen überhaupt (Benedict & Ring, 2004; Icoz & Stotzky, 2008).

Seit Beginn des landwirtschaftlichen Anbaus von transgenem BT-Mais (MON810) gibt es Bedenken zu potentiellen Risiken für natürliche und landwirtschaftliche Ökosysteme, durch die Freisetzung der δ -Endotoxine in die Umwelt. (Rissler & Mellon, 1996; Hails, 2000; Stotzky, 2000, 2002). Potentielle Risiken sind beispielsweise Auswirkungen auf Nichtzielorganismen, Pollenflug und damit verbundene Auskreuzung sowie die Überdauerung des Cry1Ab-Proteins im Boden. Deshalb ist die Freisetzung des Cry1Ab-Proteins durch BT-Maisanbau in die Umwelt seit ca. zwanzig Jahren Gegenstand der Biosicherheitsforschung.

Zum Verhalten des Cry1Ab-Proteins im Boden liegen bereits eine Reihe von Untersuchungen vor (Reviews: Yu *et al.*, 2011; Icoz & Stotzky, 2008). Da nach der Ernte des BT-Maises pro Hektar bis zu 2.000 Tonnen Cry1Ab-haltiges Pflanzenmaterial auf dem Feld zurückbleiben (eigene Berechnungen siehe Kapitel 1, Abschnitt 3.3.6), stellt der Cry1Ab-Eintrag in den Boden einen bedeutenden ökologischen Einflussfaktor dar. In Laborexperimenten wurde nachgewiesen, dass Cry1Ab an Tonminerale und Huminsäuren im Boden adsorbiert wird (Tapp *et al.*, 1994; Crecchio & Stotzky, 1998; Pagel-Wieder *et al.*, 2004). Saxena *et al.* (2002b) zeigten zudem anhand von Versickerungsversuchen in Bodensäulen, dass Cry1Ab im Boden abhängig vom Tongehalt vertikal beweglich ist. Zur Untersuchung des biologischen Abbaus von Cry1Ab im Boden gibt es jedoch unterschiedliche und zum Teil widersprüchliche Ergebnisse. Abhängig vom Versuchsdesign und den Detektionsmethoden wurde nach der Zugabe in den Boden ein vollständiger biologischer Abbau (Marchetti *et al.*, 2007; Dubelmann *et al.*, 2005) oder ein teilweiser Abbau mit gleichzeitiger Adsorption (Hopkins & Gregorich, 2003, 2004; Palm *et al.*, 1996; Zwahlen *et al.*, 2003) vermutet, sowie auch Überdauerungen des Toxins bis zu 234 Tagen nach Zugabe gemessen (Saxena *et al.*, 1999). Als mögliche ökologische Risikofaktoren wurden zudem eine Anreicherung des Cry1Ab (u.a.: Wang *et al.*, 2006; Hopkins & Gregorich, 2003) und teilweise irreversible Adsorption (Saxena *et al.*, 2001a; Chevallier *et al.*, 2001) im Boden diskutiert. Aufgrund der Limitierung der Untersuchungsmethoden waren somit konkrete Aussagen zum Einfluss der Adsorption auf den Abbau des Proteins im Boden bisher nicht möglich.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Verhalten des Cry1Ab im Boden während und nach landwirtschaftlichem Anbau von BT-Mais (MON810) an 15 Freilandstandorten im Nordosten Deutschlands untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass der Haupteintrag des Cry1Ab

in den Boden durch auf dem Feld verbliebene Maispflanzenreste nach der Ernte erfolgte. Dabei zersetzte sich ein Großteil des Proteins noch in der Pflanzenmatrix, bevor es den Boden erreichte. Im Boden wurden nur sehr niedrige Cry1Ab-Werte detektiert. Beim Vergleich der Standorte zeigte sich dabei eine deutliche Abhängigkeit zu bestimmten Bodeneigenschaften, insbesondere zum Tonanteil, aufgrund der Adsorption des Proteins an Bodenbestandteile. Für eine genaue Untersuchung zur Bedeutung der Sorption für die Mineralisation von Cry1Ab im Boden wurde zusätzlich eine Studie mit ^{14}C -markiertem Cry1Ab durchgeführt und der Abbau des ^{14}C -Cry1Ab im Boden anhand von ^{14}C -Massenbilanzen verfolgt. Da solche Verbindungen nicht kommerziell erhältlich sind, wurde zunächst die ^{14}C -markierte Verbindung im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe gentechnisch veränderter *E.coli*-Zellen hergestellt. Die Markierung erfolgte über die Zugabe von ^{14}C -Glycerin als Kohlenstoffquelle und ^{14}C -Leucin als essentieller Aminosäure ins Kulturmedium. Um eine effiziente ^{14}C -Markierung zu erreichen, musste das optimale Mengenverhältnis von markiertem und unmarkiertem Kohlenstoff im Kulturmedium ermittelt und angepasst werden. Letztendlich wurde ^{14}C -Cry1Ab mit einer spezifischen Aktivität von $8.000 - 36.000 \text{ dpm mg}^{-1}$ Cry1Ab hergestellt, die ausreichte um den Abbau im Boden zu untersuchen. Die resultierenden ^{14}C -Massenbilanzen zeigten, dass ein Teil des Cry1Ab direkt nach der Zugabe zum Boden adsorbiert wurde, während der Teil in der flüssigen Phase des Bodens einem schnellen biologischen Abbau unterlag. Anhand der Verfolgung des Abbaus über mehr als 100 Tage wurde zudem nachgewiesen, dass auch der adsorbierte Cry1Ab-Anteil kontinuierlich wieder freigesetzt und abgebaut wurde. Die zusätzlich durchgeführten PCR-SSCP-Analysen von direkt aus der Boden-DNA PCR-amplifizierten 16S rRNA Gensequenzen belegten, dass unter den im Feld maximal erreichbaren Cry1Ab-Konzentrationen keine Veränderung in der Zusammensetzung der Bodenmikroorganismengemeinschaft zu erwarten ist.

2 Ziele der Dissertation

Mit der vorliegenden Arbeit sollten offene Fragen und Unsicherheiten über den Verbleib des Cry1Ab-Proteins aus Mais MON810 im Boden unter den realen Bedingungen eines landwirtschaftlichen BT-Maisanbaus geklärt werden. Um belastbare Aussagen über die Bedeutung spezifischer Bodenfaktoren zu erzielen, wurden folgende drei Bereiche bearbeitet:

(1) Untersuchung der Überdauerung des Cry1Ab im Boden unter realen landwirtschaftlichen Bedingungen

- Messung des Cry1Ab-Gehaltes in Böden und Maiswurzeln während der Wachstumsphase des Maises sowie nach der Ernte an 15 verschiedenen Standorten im Nordosten Deutschlands
- Untersuchung der Verlagerung des Cry1Ab in tiefere Bodenhorizonte
- Charakterisierung der Freilandböden hinsichtlich physikochemischer und biologischer Bodenparameter
- Untersuchung möglicher Zusammenhänge zwischen Cry1Ab-Gehalten im Boden und den ausgewählten Bodenparametern

(2) Produktion von ^{14}C -markiertem Cry1Ab mit Hilfe des *E. coli*-Stammes HB101 pMP

- Auswahl und Optimierung von Nährmedien und Kultivierungsbedingungen zur Biosynthese von Cry1Ab Proteinen
- Herstellung von ^{14}C -Cry1Ab in Medien mit ^{14}C -markierten Kohlenstoffverbindungen mit dem Ziel, eine ausreichend hohe spezifische Aktivität sowie Reinheit des Proteins für Abbauntersuchungen in Böden zu erhalten

(3) Untersuchung des Abbaus von ^{14}C -Cry1Ab im Boden unter Laborbedingungen

- Verfolgung des ^{14}C -Cry1Ab-Abbaus im Boden mit Hilfe von ^{14}C -Massenbilanzen unter Berücksichtigung der Mineralisation, Sorption und des Einbaus in die mikrobielle Biomasse
- Ermittlung der Bedeutung der Bodentextur für den Verbleib und die Abbauraten des ^{14}C -Cry1Ab (Vergleich von zwei Bodentypen)

3 Freilandmonitoring

3.1 Einleitung

Der Anbau von gentechnisch verändertem BT-Mais wie MON810 stellt in Gebieten mit starkem Schädlingsbefall durch den Maiszünsler (*Ostrinia nubilalis*) eine Alternative zu konventionellem Maisanbau dar. Bei konventionellem Mais lässt sich dieser Schädling selbst mit hohem Insektizideinsatz kaum kontrollieren. Hingegen ist der Schutz durch die Expression des gentechnisch eingebrachten Cry1Ab Proteins, das natürlich von Bodenbakterien, die unter dem Artnamen *Bacillus thuringiensis* (BT) zusammengefasst werden, gebildet werden kann, sehr effizient. BT-Mais wird in vielen Ländern der Erde, insbesondere in Nordamerika bereits seit mehr als 10 Jahren auf sehr vielen landwirtschaftlichen Flächen angebaut. Aufgrund der gentechnischen Veränderungen ist der Anbau in Europa, darunter in Deutschland, Frankreich und Österreich, trotz einer positiven Bewertung durch die EFSA (Europäische Lebensmittelsicherheitsbehörde) und Zulassung durch die EU weiterhin umstritten und politisch blockiert. Die Ursache für den Anbau-stopp sind unter anderem Bedenken gegenüber einer möglichen Gefährdung des umgebenden Ökosystems durch die Freisetzung des Cry1Ab Proteins aus Pflanzenmaterial von MON810. Als besonders problematisch gilt dabei die Freisetzung der gentechnisch modifizierten Proteine in den Boden. Im Boden unterliegt Cry1Ab einem mikrobiellen Abbau durch die Bodenmikroorganismen (Zwahlen *et al.*, 2003; Icoz & Stotzky, 2008). Gleichzeitig findet aber auch eine Adsorption des Cry1Ab an Tonminerale und Huminstoffe statt (Crecchio & Stotzky, 1998; Wang *et al.*, 2008). Es wurde gezeigt, dass sorbierte Cry1Ab-Proteine über einen längeren Zeitraum stabil bleiben können, dem mikrobiellen Abbau also nicht oder zumindest deutlich schlechter zugänglich sind, wobei jedoch bemerkenswerterweise ihre insektizide Wirkung trotz der Sorption erhalten bleibt (Crecchio & Stotzky, 2001; Madliger *et al.*, 2011). Obwohl bisherige Ergebnisse zur Überdauerung von Cry1Ab beim BT-Maisanbau im Freiland für einen effizienten Abbau des Cry1Ab im Boden sprechen (Dubelman *et al.*, 2005; Gruber *et al.*, 2009), gibt es Bedenken, dass es durch die Adsorption zu einer längeren Überdauerung, Anreicherung und Anhäufung (Akkumulation) des Cry1Ab-Proteins im Boden, besonders bei langjährigem Anbau in Folge, kommen kann (Tapp *et al.*, 1994; Crecchio & Stotzky, 2001; Wang *et al.*, 2008). Zudem wurde gezeigt, dass Cry1Ab im Boden vertikal verlagert werden kann und somit eine potentielle Ausbreitung in das Grundwassers nicht ausgeschlossen ist (Saxena *et al.*, 2002b).

Im Freiland gelangt das Cry1Ab während des BT-Maisanbaus über absterbende Pflanzenteile, Pollen und möglicherweise auch durch Wurzelexsudation in den Boden (Hopkins & Gregorich, 2003; Gruber *et al.*, 2009). Der Haupteintrag erfolgt jedoch nach der Ernte durch auf dem Feld verbliebene Maispflanzenreste (Baumgarte & Tebbe, 2005; Zwahlen *et al.*, 2003). Der Gesamteintrag variiert dabei stark, je nach Menge der Pflanzenreste, abhängig von der Maisnutzung. Bisher wurden die Auswirkungen unterschiedlicher Standorteigenschaften, die sich aus den verschiedenen Bodenarten und Maisnutzungen ergeben nicht eingehend untersucht, obwohl die Ergebnisse einiger Studien zum Adsorptionsverhalten von Cry1Ab Abhängigkeiten zwischen Cry1Ab und physikochemischen Bodenparametern (z.B. Korngröße, pH-Wert, Bodenbiomasse) zeigten, die auch in der landwirtschaftlichen Praxis eine Rolle spielen könnten (Wang *et al.*, 2008; Pagel-Wieder *et al.*, 2007; Feng *et al.*, 2011). Zudem ist weiterhin unklar, inwieweit die bisherigen Ergebnisse einzelner Feldstudien auf Standorte in Deutschland für die Bewertung des BT-Mais-Anbaus (MON810) in der landwirtschaftlichen Praxis übertragbar sind.

In dieser Arbeit wurde deshalb in einem Freilandmonitoring das Verhalten von Cry1Ab im Boden während und nach dem landwirtschaftlichen Anbau von BT-Mais (MON810) an insgesamt 15 landwirtschaftlich genutzten Flächen Deutschlands über den Zeitraum von drei Jahren untersucht. Dabei wurde die Überdauerung des Cry1Ab in Abhängigkeit vom Anbauzeitraum, der Maisnutzung sowie den physikochemischen Eigenschaften der Böden analysiert. Die Cry1Ab-Gehalte im wurzelfreien Boden, Rhizosphärenboden und Pflanzen wurden mit dem in einer früheren Studie erprobten und verbesserten Nachweissystem auf Grundlage der ELISA-Technik mit spezifischen Antikörpern quantifiziert (Baumgarte & Tebbe, 2005). Die physikochemischen Bodenparameter Korngröße, Kationenaustauschkapazität, Wasserhaltekapazität, Kohlenstoffgehalt, Stickstoffgehalt, pH-Wert sowie der Biomassekohlenstoffgehalt wurden mit standardisierten Methoden analysiert. Anschließend wurden mit statistischen Verfahren (einfaktorielle ANOVA, Korrelationsanalysen nach Spearman, 1904) Unterschiede und Zusammenhänge zu den ermittelten Cry1Ab-Gehalten überprüft. Aus den Ergebnissen sollten sich allgemeine Erkenntnisse zum Einfluss von physikochemischen Bodeneigenschaften auf die Überdauerung von Cry1Ab-Proteinen ableiten lassen, die damit Vorhersagen zur Überdauerung von Cry1Ab-Proteinen aus BT-Mais im landwirtschaftlichen Kontext ermöglichen.

3.2 Material und Methoden

3.2.1 Standorte

Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden insgesamt 15 landwirtschaftlich genutzte Flächen im norddeutschen Raum ausgewählt. Tabelle 1 gibt eine Übersicht der Untersuchungsstandorte sowie den zugehörigen Bodenklassen und auftretenden Wetterbedingungen (Jahresmittelwerte des Niederschlags, Temperatur).

Tabelle 1: Übersicht zu Bodenart, Bodenklasse, mittlerem Jahresniederschlag und mittlerer Jahrestemperatur sowie die topographische Einordnung der Untersuchungsstandorte

Standort	Feldbezeichnung	Bodenklasse ^a	Mittl. Jahrestemperatur (°C) ^b	Mittl. Jahresniederschlag (mm) ^b	Topographische Einordnung (°)
Mädewitz	F15	Vega-Gley-Pseudogley	7,5 - 8,5	470 - 550	Oderbruch
Neureetz	F14	Vega-Gley-Pseudogley			
Altreetz	F12 & F13	Vega-Gley			
Mallnow	F6	Braunerde-Fahlerde			
Altlangsow	F2	Vega-Gley			
Altlangsow	F7	pseudovergleyter Vega-Gley			
Alt Zeschdorf	F1	Fahlerde-Braunerde			
Gusow	F4	Vega-Gley	8,5	550	Südlich des Barnim
Hohenstein	F8	Braunerde-Fahlerde			
Wendhausen	F5	Braunerde-Pseudogley			
Groß Lüsewitz	F3 & F9	Parabraunerde			
Wulfen	F10	Braunerde-Tschernosem			
Mügelin	F11	Parabraunerde	9,1	504	Nördlich der Dübener Heide

a Bodengeologische Basiskarte Brandenburg 1:50 000 (BK 50)

b Quelle: Deutscher Wetterdienst

c Diercke Weltatlas, 1992

Vorraussetzung für ihre Auswahl war der Anbau von BT-Mais MON810 und die Erlaubnis der jeweiligen Landwirte bzw. Standortverantwortlichen, Pflanzen und Bodenproben entnehmen zu dürfen. Bei zwei Standorten handelte es sich um Versuchsfelder der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (BBA) in Groß Lüsewitz (Mecklenburg-Vorpommern) und in Wendhausen (Niedersachsen). Zwei landwirtschaftlich

genutzte Flächen befanden sich in Wulfen (Sachsen Anhalt) und in Mügeln (Sachsen-Anhalt). Die übrigen Flächen befanden sich im landwirtschaftlich intensiv genutzten Bereich des Oderbruchs (Brandenburg), und zwar im Gebiet von Altreetz, Neureetz, Mädewitz, Alt Zeschdorf, Altlangsow, Gusow, Mallnow, sowie Hohenstein. Das Oderbruch stellt die fruchtbarste Ackerbauregion Brandenburgs dar und gehört zu den ausgewiesenen Befallsgebieten (Liebe, 2004) durch den Maiszünsler (*Ostrinia nubilalis*). Bei den Standorten im Oderbruch dominierten grundwasserbeeinflusste braune Auenböden (Vega-Gley) aus Auensand und Auenlehm. Bei den anderen Standorten handelt es sich zumeist um Braunerdetypen, teilweise mit Staunäseeinfluss (Wendhausen) und/oder stattfindender Lessivierung (Mallnow, Alt Zeschdorf, Hohenstein, Groß Lüsewitz, Mügeln). Die Jahresmittelwerte des Niederschlags und der Temperatur lagen bei allen Standorten in der gleichen Größenordnung. Die niedrigste Jahresmitteltemperatur fand sich im Oderbruch mit 7,5 °C und die höchste in Wendhausen mit 9,6 °C. Das Jahresniederschlagsminimum wiesen die Flächen des Oderbruchs mit 470 mm und das Maximum Groß Lüsewitz mit 679 mm, aufgrund seiner Küstenlage, auf.

3.2.2 Probenahmen an den Freilandstandorten

Die Probenahmen wurden an Freilandstandorten mit ehemaligem oder aktuellem BT-Maisanbau durchgeführt. Bei den Standorten mit ehemaligem Anbau wurde BT-Mais ein bis zwei Jahre vor Projektbeginn (2005) angebaut (F12, F13, F14 und F15), bei zwei Feldern handelte es sich um zweijährigen Anbau in Folge (F12 und F13). Hier konnten nur Bodenproben von wurzelfreiem Boden untersucht werden, da mit Ausnahme von Standort F12 keine Pflanzenreste mehr auffindbar waren.

An allen Standorten mit aktuellem BT-Maisanbau (ab 2005) wurde die Probenahmen zur Maisblüte (BBCH65 (Weber & Bleiholder, 1990; Lancashire *et al.*, 1991)) und vier bis sechs Wochen nach der Ernte durchgeführt. Es wurden Proben von wurzelfreiem Boden (Boden zwischen den Pflanzreihen), Rhizosphärenboden (Boden im Wurzelballen) und Maiswurzeln genommen. In der Folgezeit wurden halbjährlich im Frühjahr und Herbst Bodenproben und, nach Möglichkeit, Wurzelreste entnommen.

Die Proben wurden bis maximal 3 Jahre nach der Ernte des letzten BT-Mais Anbaus entnommen, oder es wurden keine weiteren Proben genommen, wenn kein Cry1Ab in den Bodenproben mehr nachweisbar war.

Tabelle 2 gibt eine Übersicht über die Untersuchungsstandorte, den Anbauzeitraum von BT-Mais, die Maisnutzung nach der Ernte, die Maissorte sowie die Art der untersuchten Proben (vgl. auch Anhang 1).

Tabelle 2: Übersicht über die Probenahme­flächen, Probenbezeichnung, angebaute Maissorte, Anbauzeitraum, Maisnutzung sowie Art der Proben
(GPS-Daten siehe Anhang 2)

Standorte	Feldbezeichnung	Maissorte	Event	Maisnutzung	Anbauzeitraum	Probenart			
						Wurzel-freier Boden	Rhizo-sphären-boden	Frische Wurzeln	Alte Wurzeln
Alt Zeschdorf	F1	TXP138F	MON810	Silomais	2005	x	x	x	x
Altlangsow	F2	TXP138F	MON810	Körnermais	2005	x	x	x	x
Groß Lüsewitz	F3	PR39V17	MON810	Silomais	2005 - 2006	x	x	x	x
Gusow	F4	TXP138F	MON810	Körnermais	2005	x	x	x	x
Wendhausen	F5	PR39V17	MON810	Silomais	2005 - 2007	x	x	x	x
Mallnow	F6	TXP138F	MON810	Silomais	2006	x	x	x	x
Altlangsow	F7	TXP138F	MON810	Körnermais	2006	x	x	x	x
Hohenstein	F8	TXP138F	MON810	Körnermais	2006	x	x	x	x
Groß Lüsewitz	F9	Kuratus	MON810	Silomais	2007	x	x	x	-
Wulfen	F10	DKc3421YG	MON810	Körnermais	2007	x	x	x	-
Mügeln	F11	DKc3421YG	MON810	Körnermais	2007	x	x	x	-
Altreetz A	F12	TXP138F	MON810	k.A.*	2002 - 2004	x	-	-	x
Altreetz B	F13	TXP138F	MON810	k.A.*	2002 - 2003	x	-	-	-
Neureetz	F14	TXP138F	MON810	k.A.*	2003	x	-	-	-
Mädewitz	F15	TXP138F	MON810	k.A.*	2004	x	-	-	-

*k.A. - keine Angabe

An allen Standorten wurde vor dem angegebenen Anbauzeitraum kein BT-Mais kultiviert. Auf 11 Feldern wurde der BT-Mais für ein Jahr angebaut, danach erfolgte ein Fruchtwechsel. Bei F3 und F13 wurde der BT-Mais zwei Jahre in Folge angebaut, bei F5 und F12 drei Jahre in Folge. Auf allen Feldern wurde der Mais nach guter landwirtschaftlicher Praxis kultiviert, sowohl auf den Versuchsfeldern der BBA (F3, F5 und F9) als auch auf den landwirtschaftlich genutzten Flächen.

Bei den landwirtschaftlich genutzten Flächen erfolgten die Probenahmen an fünf festgelegten, mit GPS eingemessenen, Punkten im Feld, wobei ausgehend davon Mischproben aus drei Unterpunkten um den Hauptpunkt herum genommen wurden (siehe Abbildung 1, vgl. Anhang 2). Bei der Festlegung der Entnahmepunkte wurde beachtet, dass ein Mindestabstand von 20 m zur Mantelsaat eingehalten wurde (als Mantelsaat wurde konventioneller Mais gepflanzt; dies galt auch für die landwirtschaftlich genutzten Flächen). Die Abstände zwischen den Hauptpunkten wurden der Feldgröße und topographischen Gegebenheiten angepasst. Als Kontrollen dienten Bodenproben, die von angrenzenden mit konventionellem Mais bepflanzten Feldern entnommen wurden. Auf den Versuchsfeldern wurden die dort durch die Versuchsleiter festgelegten Probenahmepunkte als Hauptpunkte genutzt.

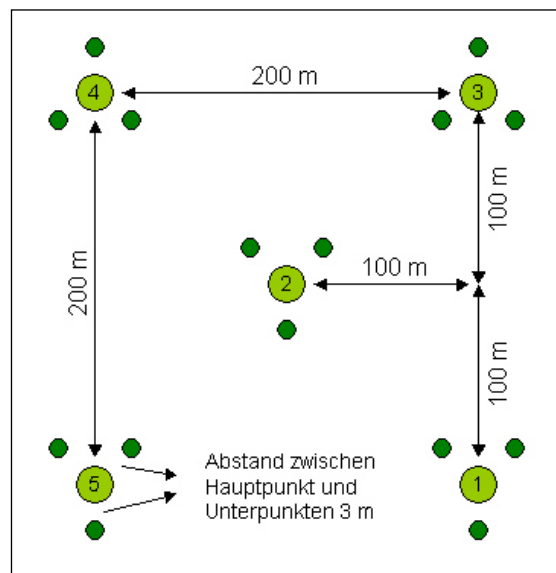


Abbildung 1: Übersichtsskizze zur Festlegung der Probenahmepunkte auf den Untersuchungsflächen

Die Proben des wurzelfreien Bodens wurden mit einer Schaufel aus dem Pflughorizont (0 - 20 cm Tiefe) genommen und in Plastiktüten abgefüllt. Die getrocknete oberste Schicht von ca. 1 cm wurde verworfen. Es wurde jeweils eine Mischprobe von 12 kg (Feuchtwicht, FW) genommen.

Der Rhizosphärenboden wurde gewonnen, indem der gesamte Maiswurzelballen mit einem Spaten vorsichtig ausgegraben und von einer Plastiktüte umschlossen wurde, in der dann der Boden von den Wurzeln geschüttelt wurde. Auch hier wurde eine Mischprobe des Bodens aus drei Wurzelballen (vgl. Abbildung 1) genommen. Die Wurzelballen wurden gleichzeitig als Wurzelprobe genutzt und ebenfalls in Plastiktüten verpackt. Die Plastiktüten wurden mit einem Wattestopfen und Gummiband verschlossen, so dass ein Luftaustausch möglich war. Die Proben wurden in einer Kühlbox transportiert und für maximal eine Woche nach der Probenentnahme bis zur weiteren Analytik im Kühlraum bei 4°C gelagert. Die Wurzelproben wurden bei -20°C gelagert.

3.2.3 Extraktion und Nachweis von Cry1Ab-Proteinen aus Boden- und Pflanzenmaterial

Die Cry1Ab-Gehalte im Boden und in den Wurzeln wurde mit Hilfe des Agdia ELISA-Kits für Cry1Ab/Cry1Ac (PathoScreen DAS ELISA-Kit Cry1Ab/Cry1Ac, Agdia, Linaris Biologische Produkte GmbH, Wertheim-Bettingen) gemessen. Dabei handelte es sich um ein *Double Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (DAS-ELISA) mit dem das in der Probe enthaltene Cry1Ab im Bereich von 0,1 bis 8,0 ng ml⁻¹ quantitativ bestimmt werden konnte. Als Standard wurde der im ELISA-Kit enthaltene Cry1Ab-Standard von Agdia verwendet. Als quantitative Bezugsgröße wurden für alle Boden- und Wurzelproben parallel zur Cry1Ab-Messung die Trockengewichte des Bodens bzw. des Pflanzenmaterials bestimmt.

3.2.3.1 Abschätzung des Detektionslimits für die Cry1Ab-Quantifizierung

Das Detektionslimit für die Cry1Ab-Quantifizierung mit ELISA wurde nach der statistischen Methode von Vogelgesang & Hädrich (1998) berechnet. Es bezeichnet dabei die untere Grenze des Konzentrationsbereichs, bei der der aus einmaliger Messung ermittelte Cry1Ab-Gehalt in der Probe als „detektiert“ gilt. Würde ein und dieselbe Probe mit einem tatsächlichen Cry1Ab-Gehalt vom Wert des Detektionslimits ausreichend häufig gemessen werden, ergäbe sich eine statistische Gauß-Verteilung der Messergebnisse, wobei 50 % der Messwerte oberhalb und 50 % unterhalb des Detektionslimits lägen. Bei der einmaligen Messung dieser Probe bestünde also eine 50 % Wahrscheinlichkeit, dass der Cry1Ab-Gehalt als „detektiert“ angesehen werden würde. Neben dem statistischen Detektionslimit wurde noch das sog. Identifikationslimit berechnet. Das ist die untere Grenze der Cry1Ab-Konzentration in einer Probe, die bei einmaliger Messung zu 95 % detektiert werden würde.

3.2.3.2 Ermittlung der Extraktionseffizienz

Die Extraktionseffizienz für Cry1Ab wurde an Bodenproben von den Kontrollflächen der Untersuchungsstandorte F2, F3 und F5 in Anlehnung an Baumgarte & Tebbe (2005) überprüft. Es wurde jeweils 1 g frischer, gesiebter Boden mit in destilliertem Wasser gelöstem Cry1Ab (Agdia-Cry1Ab-Standard, Linaris Biologische Produkte GmbH, Wertheim-Bettlingen) so versetzt, dass ein Wassergehalt von 60 % der maximalen Wasserhaltekapazität erreicht wurde und sich Endkonzentrationen von 0,18 ng, 4 ng und 10 ng Cry1Ab pro g Boden ergaben. Der Boden wurde jeweils für 1 h bei 4°C im Dunkeln inkubiert, um die Sorption des Cry1Ab an die Bodenbestandteile zu ermöglichen. Durch die Inkubation bei 4°C sollte die mikrobielle Aktivität und damit der mikrobiologische Abbau von Cry1Ab minimiert werden. Nach der Inkubation wurde das Cry1Ab aus dem Boden mit der gleichen Methode extrahiert wie für wurzelfreien Boden beschrieben (siehe Kapitel 1, Abschnitt 3.2.3.3) und anschließend mit ELISA, entsprechend den Herstellerangaben, quantifiziert.

3.2.3.3 Analysen aus wurzelfreiem Boden

Für den quantitativen Nachweis von Cry1Ab aus wurzelfreien Bodenproben wurde 1 g frischer, gesiebter (2 mm Analysensieb, Retsch GmbH, Haan) Boden mit 3 ml Agdia-Extraktionspuffer in einem Oakridgetube (Nalgene Labware, Fisher Scientific GmbH, Schwerte) versetzt und für 30 s auf einem Vortex-Apparat (Vortex VF2, IKA Labortechnik, Staufen) auf höchster Stufe gemischt. Danach wurden die Proben für 30 min mit 16.000 x g und bei 4 °C zentrifugiert (Zentrifuge Sigma 6K10, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz), der Überstand vorsichtig mit einer Eppendorfpipette (Volumen 100 - 1000 µl, Eppendorf, Hamburg) abgenommen und in 15 ml Falcontubes (Sarstedt, Nümbrecht) überführt. Wenn der Überstand nach der ersten Zentrifugation noch nicht klar war, was besonders tonreichen Böden der Fall war, wurde der abgenommene Überstand noch einmal für 5 min mit 16.000 x g bei 4°C zentrifugiert und wieder vorsichtig abgenommen und in ein Falcon-Tube überführt. Anschließend wurden die Extrakte mit Centricon®-Zentrifugen Filtereinheiten (Centricon® Ultracel YM-10, Ausschlussgrenze 10.000 Dalton, Merck Millipore, Billerica, USA) für die anschließende ELISA-Messung gemäß den Herstellerangaben aufkonzentriert. Jede Filtereinheit wurde dabei nur einmal verwendet. Die Extrakte wurden von 2 ml auf 115 µl reduziert, was einer 17,4 - fachen Aufkonzentration entsprach. Aus diesen aufkonzentrierten Extrakten wurden danach direkt die Cry1Ab Gehalte im ELISA gemessen. Die ELISA-Messung wurde, wie vom Hersteller angegeben, durchgeführt. Zur Erhöhung der Extraktionsausbeute wurde jede Bodenprobe dreimal extrahiert und im Mikrotiterplatten-Spectrophotometer gemessen (Vmax Microplate Reader, MWG Biotech, Menlo Park, CA, USA).

3.2.3.4 Analysen aus Rhizosphäre-Material

Zum Nachweis von Cry1Ab aus Rhizosphärenboden wurde die gleiche Methode wie unter 3.2.3.3 beschrieben verwendet. Um Messfehler aufgrund von Wurzelresten in den Bodenproben zu vermeiden, wurden die sichtbaren Feinwurzeln mit einer Pinzette vorsichtig aussortiert und zusätzlich für jede Probe drei Extraktionsparallelen angesetzt. Aus jeder Bodenprobe wurde dreimal 1 g Boden mit 3 ml Agdiapuffer extrahiert, zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Aus jeder Parallele wurde dann 1 ml Überstand in ein 15 ml Falcon-Tube zusammengeführt, so dass sich 3 ml Mischprobe pro Bodenprobe ergab. Die Proben wurden wie bei der Messung im wurzelfreien Boden mit Centricon-Säulen aufkonzentriert und anschließend die Cry1Ab Gehalte im ELISA gemessen. Auch hier wurde für jede Bodenprobe eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

3.2.3.5 Analysen aus Maiswurzeln

Zur Ermittlung der Cry1Ab-Gehalte aus den Maiswurzeln wurden diese zunächst kurz mit einer 0,85 % sterilen NaCl-Lösung gewaschen, um anhaftende Bodenpartikel zu entfernen. Danach wurden die Wurzeln mit einem sterilen Skalpell in kleinere Teile zerschnitten und das zerkleinerte Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff zu einem Pulver zermörsert (Haldenwanger Technische Keramik GmbH & Co KG, DIN 12906, Berlin). Das gemörserte Pflanzenmaterial wurde in 50 ml Falcon-Tubes überführt und bis zur ELISA-Messung bei -70 °C gelagert. Zur Extraktion der Cry1Ab Proteine aus den Wurzeln wurden 30 - 50 mg gemörsertes Pflanzenmaterial mit 0,5 ml Agdia-Extraktionspuffer in einem 1,5 ml Eppendorf-Tube versetzt und für 30 s mit einem Minipistill gemahlen. Anschließend wurden die Proben für 5 min mit 14.000 x *g* zentrifugiert (Zentrifuge 5417C, Eppendorf) und die klaren Überstände in frische Eppendorf-Tubes (1,5 ml) überführt. Die Extrakte wurden danach direkt im ELISA gemessen. Dabei war bei frischen Wurzeln aufgrund des hohen Cry1Ab-Gehaltes eine Verdünnung von 1:250 notwendig. Es wurde für jede Pflanzenprobe eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

3.2.4 Berechnung der Cry1Ab-Eintragsmengen in Freilandboden

Es konnte davon ausgegangen werden, dass der Haupteintrag von Cry1Ab in den Boden im Freiland nach der Ernte durch auf dem Feld verbliebene Cry1Ab-haltige Maispflanzenreste erfolgte (vgl. Baumgarte & Tebbe, 2005). Die Menge des Cry1Ab-haltigen Pflanzenmaterials das auf einem Feld verbleibt, kann in Abhängigkeit von der Maisnutzung stark variieren: Beim Körnermais werden nur die reifen Kolben geerntet und der Rest der Pflanze verbleibt auf dem Feld, während beim Silomais nur die Wurzeln auf dem Feld verbleiben und so weniger pflanzliche Biomasse in den Boden eingearbeitet wird. Für die eigenen Untersuchungen wurden die Cry1Ab-Eintragsmengen in den Freilandboden

berechnet, indem die Bepflanzungsdichte (Pflanzen kg ha^{-1}) mit der durchschnittlichen Cry1Ab-Menge pro Pflanzenrest (Cry1Ab $\mu\text{g kg}^{-1}$) multipliziert wurde. Die Bepflanzungsdichte wurde ermittelt, in dem auf allen Standorten die Menge der Maispflanzen pro Quadratmeter manuell gezählt, gewogen und danach der Mittelwert gebildet wurde. Die Gewichte der Maispflanzen und Maiswurzeln wurden vor der Analyse des Cry1Ab-Gehaltes ermittelt, so dass der Durchschnittswert gebildet werden konnte. Die Mittelwerte für die Cry1Ab-Gehalte in den Wurzeln wurden aus den eigenen Messwerten gebildet und die Mittelwerte für die oberirdischen Pflanzenteile wurden der Literatur entnommen (Nguyen & Jehle, 2007).

3.2.5 Bestimmung physikochemischer und biologischer Bodeneigenschaften

Zur Korrelation von Cry1Ab-Konzentrationen mit Bodeneigenschaften wurden der pH-Wert, der Kohlenstoff- und Stickstoffgehalt, das C/N-Verhältnis, die Korngrößenverteilung, die maximale Wasserhaltekapazität, die Kationenaustauschkapazität sowie der Biomassekohlenstoffgehalt ermittelt. Die Korngrößenbestimmung wurde dabei extern vom Institut für Boden und Umwelt der LUFA-Nord-West durchgeführt. Die zugehörigen statistischen Auswertungen der Messergebnisse sind im Kapitel 1, Abschnitt 2.6 genau erklärt.

3.2.5.1 Ermittlung des pH-Wertes

Der pH-Wert der Böden wurde nach der DIN-Vorschrift 19684 Teil 1 „Bestimmung des pH-Wertes des Bodens und Ermittlung des Kalkbedarfs“ bestimmt. Dafür wurden 20 g lufttrockener, gesiebter (Analysensieb 2 mm, Retsch GmbH, Haan) Boden mit 50 ml einer 0,01 M CaCl_2 -Lösung versetzt und intensiv gerührt. Die Bodenlösung wurde eine Stunde stehen gelassen und danach erneut gründlich durchgerührt. Anschließend erfolgte die elektrometrische pH-Messung (pH Meter HI 221, Hanna Instruments Deutschland GmbH, Kehl am Rhein).

3.2.5.2 Korngrößenanalyse

Die Korngrößenanalyse wurde vom Institut für Boden und Umwelt der LUFA-Nord-West durchgeführt. Die Bodenuntersuchung erfolgte nach der ISO-Vorschrift 11277 „Bodenbeschaffenheit - Bestimmung der Partikelgrößenverteilung in Mineralböden - Verfahren mittels Siebung und Sedimentation“. Es wurden die Anteile von Ton ($< 0,002$ mm), Feinschluff (0,002 - 0,0063 mm), Mittelschluff (0,0063 - 0,02 mm), Grobschluff (0,02 - 0,063 mm), Feinsand (0,063 - 0,2 mm) sowie Mittel- und Grobsand (0,2 - 2 mm) bestimmt.

3.2.5.3 Ermittlung des Kohlenstoff- und Stickstoffgehaltes

Zur Bestimmung des Kohlenstoff- und Stickstoffgehalts des Bodens wurden 10 g Boden bei 105 °C im Trockenschrank (ULM400, Memmert, Schwabach) über 24 h getrocknet und danach für 10 min fein zermahlen (elektrischer Achatmörser, Pulverisette 2, AF, Fritsch GmbH, Idar-Oberstein). Anschließend erfolgte die Messung des C- und N-Gehalts im Elementaranalysator (TruSpec® CN, Leco Corporation, St. Joseph, Michigan, USA). Es wurden pro Probe vier Parallelmessungen durchgeführt.

3.2.5.4 Ermittlung des Biomasse-Kohlenstoffgehaltes

Der Kohlenstoffgehalt der Bodenbiomasse wurde mit der Chloroform-Fumigation-Extraktionsmethode (CFE) bestimmt (Vance *et al.*, 1987; Schlichting *et al.*, 1995). Dafür wurden vier Parallelen mit jeweils 20 g naturfeuchtem Boden mit Chloroform in einem Exsikkator für 24 h im Dunkeln bei Raumtemperatur begast („fumigiert“). Zu trockene Bodenproben wurden mit ddH₂O auf Feldkapazität angefeuchtet. Nach Entfernung des Chloroforms durch vollständige Belüftung wurde den Proben 80 ml 0,5 M K₂SO₄-Lösung zugegeben und 30 min bei 200 U min⁻¹ geschüttelt. Vier Parallelen pro Bodenprobe wurden ohne vorherige Fumigation entsprechend extrahiert. Danach erfolgte eine Filtration der Extrakte durch Faltenfilter (Typ 602 H $\frac{1}{2}$, Schleicher & Schuell, Dassel). Die Extrakte wurden bis zur Messung bei -20°C gelagert. Die Messung des Kohlenstoffs erfolgte mit dem Liqui-TOC Analysator (Analysentechnik GmbH, Hamburg). Der Biomasse-Kohlenstoffgehalt wurde aus der Differenz der C-Gehalte der Proben mit und ohne Fumigation und anschließender Multiplikation mit dem empirisch ermittelten Faktor 2,64 (Vance *et al.*, 1987) berechnet. Durch den empirischen Faktor wird die unvollständige Extraktion des Biomasse-Kohlenstoffs berücksichtigt.

3.2.5.5 Ermittlung der Kationenaustauschkapazität

Die Kationenaustauschkapazität gibt die Summe der negativen Bindungsplätze eines Bodens an. Aufgrund ihrer pH-Abhängigkeit wird zwischen potentieller (KAK_{pot}) und effektiver Kationenaustauschkapazität (KAK_{eff}) unterschieden. Während die KAK_{pot} die maximale Anzahl von freien Bindungsplätzen bei einem neutralen pH-Wert angibt, bezieht sich die KAK_{eff} auf die Anzahl der tatsächlich freien Bindungsplätze bei einem aktuellen pH-Wert des Bodens. In der vorliegenden Arbeit wurde die ökologisch wirksame KAK_{eff} bestimmt. Die Bestimmung der KAK_{eff} erfolgte durch Zugabe eines bodenfremden Kations, das die am Austauscher gebundenen Kationen verdrängt. Die KAK_{eff} wurde über die Abnahme der Konzentration des bodenfremden Kations in der Lösung bestimmt. Als bodenfremdes Kation wurde der monovalente Silberthioharnstoffkomplex (AgTU) genutzt, der eine hohe Affinität zu den negativen Ladungen der Austauscher besitzt (Chabra

et al., 1975; Pleysir *et al.*, 1980; Dohrmann, 2006). Es wurden 1 g (bei Tonen) bis 5 g (bei Sanden) lufttrockener und gesiebter Boden (Analysensieb 2 mm, Retsch GmbH, Haan) für die Analyse genutzt. Da die Anzahl der freien Bindungsplätze mit der Korngröße korreliert, musste die Menge der Bodenprobe für die Analyse durch eine Testmessung entsprechend angepasst werden. Bei sandigen Böden kann es vorkommen, dass keine signifikante Abnahme des Silbergehaltes in der Lösung gemessen wird, dann kann die Probenmenge bis maximal 5g erhöht werden. Der Boden wurde mit 80 ml Silberthioharnstoff-Lösung (1,5 l 0,15 M Thioharnstoff unter Rühren mit 0,5 l 0,04 M AgNO₃ gemischt) versetzt und zwei Stunden im Überkopfschüttler (Reax 2, Heidolph Instruments, Schwabach) im Dunkeln geschüttelt. Mit einer Blindlösung wurde entsprechend verfahren. Danach wurde die Bodenlösung 10 min bei 28,000 x g zentrifugiert (Sigma 6K10, Sigma Laborzentrifugen) und anschließend der klare Überstand in ein 100 ml-Messbecher dekantiert. Das nach dem Kationenaustausch noch im Überstand enthaltene Ag wurde durch Messung der Überstandslösung am Atomabsorptionsspektrophotometer (SpectrAA 600, Varian, Darmstadt) ermittelt. Die KAK_{eff} wurde dann aus den Differenzen der Ag-Konzentration der Überstandslösung und der Blindlösungen berechnet und in mmol_c · (kg Boden)⁻¹ angegeben (Schlichting *et al.*, 1995).

3.2.5.6 Ermittlung der maximalen Wasserhaltekapazität

Die maximale Wasserhaltekapazität definiert sich als die maximale Wassermenge, die ein Boden entgegen der Schwerkraft festhalten kann (Leser *et al.*, 1995). Es wurden 50 g naturfeuchter Boden in einen offenen Glaszylinder, der an einer Seite mit einem dichten Nylonnetz geschlossen war, eingewogen. Der Glaszylinder mit dem Boden wurde in einem geeigneten Glasbecher so positioniert, dass vorsichtig Wasser (ddH₂O) zugegeben werden konnte, wodurch sich der Boden von unten nach oben langsam mit Wasser sättigte. Es wurde soviel Wasser zugegeben bis der Boden komplett unter Wasser stand. Dann wurden die Glaszylinder mit dem Boden aus den Glasbechern genommen, für 6 h auf ein Sieb gestellt, so dass das überschüssige Wasser komplett abtropfen konnte (Fierer & Schimel, 2002). Danach wurde der Glaszylinder mit der feuchten Bodenprobe gewogen, für 24 h im Trockenschrank (Trockenschrank ULM400, Memmert, Schwabach) bei 105 °C getrocknet und nochmals gewogen. Gleichzeitig wurde die Ausgangsfeuchte des Bodens bestimmt. Aus der so bestimmten Wasseraufnahme und dem Wassergehalt des naturfeuchten Bodens wurde die maximale Wasserhaltekapazität berechnet (Alef, 1991).

3.2.6 Statistische Auswertungen

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der Software SPSS Statistics 17.0. Für alle Felddaten wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit dem Signifikanz-

niveau $\alpha = 0,05$ durchgeführt. Ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den Feldmittelwerten, wurde bei Inhomogenität der Varianzen ein anschließender Games-Howell-Test zum paarweisen Mittelwertvergleich durchgeführt und bei Varianzhomogenität der Tukey-Test. Die Homogenität der Varianzen wurde mit dem Levene-Test überprüft (Levene, 1960; Roberts & Russo, 1999).

Die Korrelation zwischen dem Cry1Ab-Gehalt und den gemessenen physikochemischen Bodenparametern wurde im Rhizosphärenboden zur Maisblüte und im wurzelfreien Boden nach der Ernte mit Hilfe des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman („Spearman’s Rho“, Spearman, 1904; Fahrmeier *et al.*, 2007) untersucht. Hierbei wurde die Signifikanz zweiseitig getestet und das Signifikanzniveau lag bei $\alpha = 0,01$.

3.3 Ergebnisse

3.3.1 Bestimmung der Extraktionseffizienz für die Cry1Ab-Quantifizierungen

Um die Effizienz und Vergleichbarkeit der Extraktion von Cry1Ab Proteinen aus Böden unterschiedlicher Standorte zu überprüfen, wurden Bodenproben von den Kontrollflächen der Untersuchungsstandorte F2, F3 und F5 mit verschiedenen Cry1Ab-Konzentrationen versetzt und anschließend wieder extrahiert (siehe Kapitel 1, Abschnitt 2.3.2). Diese Böden unterschieden sich insbesondere in ihren Texturen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 2 dargestellt. Die bodenphysikalischen Parameter der Kontrollböden stimmten mit denen der zugehörigen mit BT-Mais bepflanzten Böden überein, so dass die Unterschiede vernachlässigt werden konnten. Bei den Böden handelte es sich um einen lehmigen Ton (F2), einen mittellehmigen Sand (F3) und einen sandig-tonigen Lehm (F5) (vgl. Tabelle 1).

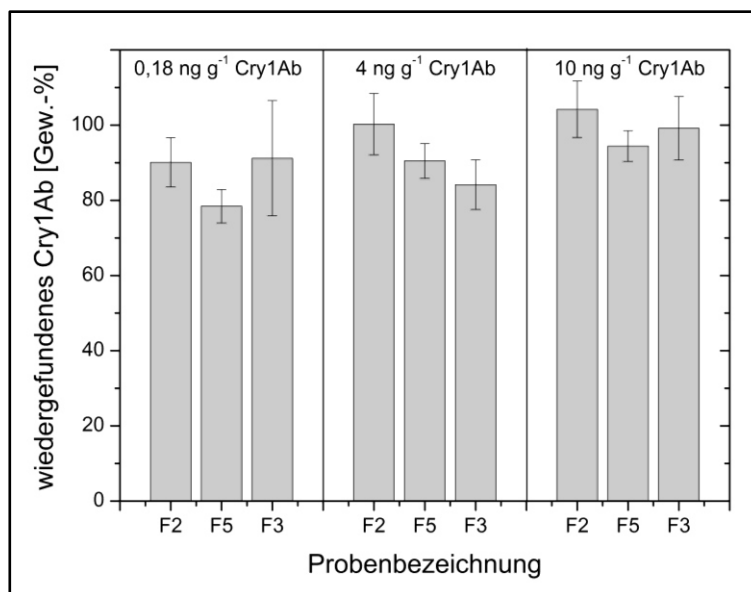


Abbildung 2: Wiederfindung des dem Boden zugesetzten reinen Cry1Ab (Cry1Ab-Ausgangskonzentrationen sind über den Balken angegeben)

Die Wiederfindung des Cry1Ab war abhängig von der Cry1Ab-Ausgangskonzentration. Es wurde tendenziell mehr Cry1Ab wiedergefunden, wenn mehr Cry1Ab dem Boden zugesetzt worden war. Diese Unterschiede waren jedoch statistisch nicht signifikant. Bei der niedrigsten Zugabe-Konzentration von 0,18 ng Cry1Ab g⁻¹ Boden lag die Wiederfindung im Mittel bei 87 %. Bei einer höheren Konzentration von 4 ng g⁻¹ wurden im Mittel 92 % wieder extrahiert und bei der höchsten Konzentration von 10 ng g⁻¹ wurden

im Mittel 99 % wiedergefunden. Zwischen den Böden zeigten sich bei allen Zugabe-Konzentrationen ebenfalls keine signifikanten Unterschiede.

Die niedrigste Zugabe-Konzentration von $0,18 \text{ ng g}^{-1}$ lag in einem Bereich, der auch unter realen Bedingungen im Feld erreicht wurde (vgl. Kapitel 1, Abschnitt 3.3.3). Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass bei der Cry1Ab-Quantifizierung im Freilandboden im Mittel nur 87 % des im Boden enthaltenen Cry1Ab auch tatsächlich detektiert wurde.

3.3.2 Statistisches Detektionslimit für die Cry1Ab-Quantifizierungen

Für den Cry1Ab-Gehalt im Extrakt wurde nach der Methode von Vogelgesang und Hädrich (1998) ein statistisches Detektionslimit von $0,007 \text{ ng ml}^{-1}$ ermittelt, was einem Wert von $0,02 \text{ ng g}^{-1}$ Boden (TG) entsprach und für die einmalige Messung einer Probe gilt. Das zugehörige Identifikationslimit lag bei einer Cry1Ab-Konzentration von $0,04 \text{ ng g}^{-1}$ Boden. Nach Vogelgesang & Hädrich (1998) sollten Werte die unterhalb des Identifikationslimits liegen, aber größer gleich dem Detektionslimit sind, nur als „detektiert“ bezeichnet werden, ohne Angabe der numerischen Werte. Da in dieser Arbeit ein Großteil der ermittelten Cry1Ab-Konzentrationen im Freilandboden aber sehr nah am Detektionslimit lagen, wurden für eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse immer die numerischen Werte der gemessenen Konzentrationen angegeben. Zudem wurde die Messgenauigkeit durch konsequente Dreifachbestimmung aller Proben erhöht. Cry1Ab-Gehalte deutlich unterhalb des Detektionslimits, jedoch signifikant unterschiedlich von den Messwerten der Kontrollen, wurden im Folgenden als „Spuren“ deklariert.

3.3.3 Cry1Ab-Gehalte in Boden und Pflanzen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 15 unterschiedliche landwirtschaftlich genutzte Flächen im Zusammenhang mit dem Anbau von BT-Mais (MON810) zum Vorkommen des Cry1Ab-Proteins im Boden und in Maispflanzen untersucht. Die beprobten Standorte variierten von Jahr zu Jahr, abhängig davon, ob im jeweiligen Jahr ein Anbau mit BT-Mais (MON810) stattfand. Bei Standorten mit mehrjährigem BT-Maisanbau wurden die Standortbezeichnungen mit den zugehörigen Jahreszahlen indiziert (z.B. BT-Maisanbau im Jahr 2005 und 2006 auf Standort F5 wurde gekennzeichnet als F5⁽⁰⁵⁾ und F5⁽⁰⁶⁾). Als Kontrollen dienten angrenzenden Flächen, auf denen konventioneller Mais angebaut wurde. Es wurden in keinem Fall Cry1Ab-Proteine außerhalb des eigentlichen BT-Maisfeldes gefunden (Daten siehe Anhang 3 und 4).

3.3.3.1 Cry1Ab-Gehalt im wurzelfreien Boden

Die in den Jahren 2005 bis 2007 ermittelten Cry1Ab-Gehalte während der Maisblüte sowie 4 bis 6 Wochen nach der Ernte sind in Abbildung 3 als Feldmittelwerte dargestellt. Die Maisnutzung nach der Ernte wurde farblich gekennzeichnet, da abhängig davon sehr unterschiedliche Mengen an Cry1Ab-haltigem Pflanzenmaterial auf dem Feld verblieben (vgl. Kapitel 1, Abschnitt 3.3.3.6).

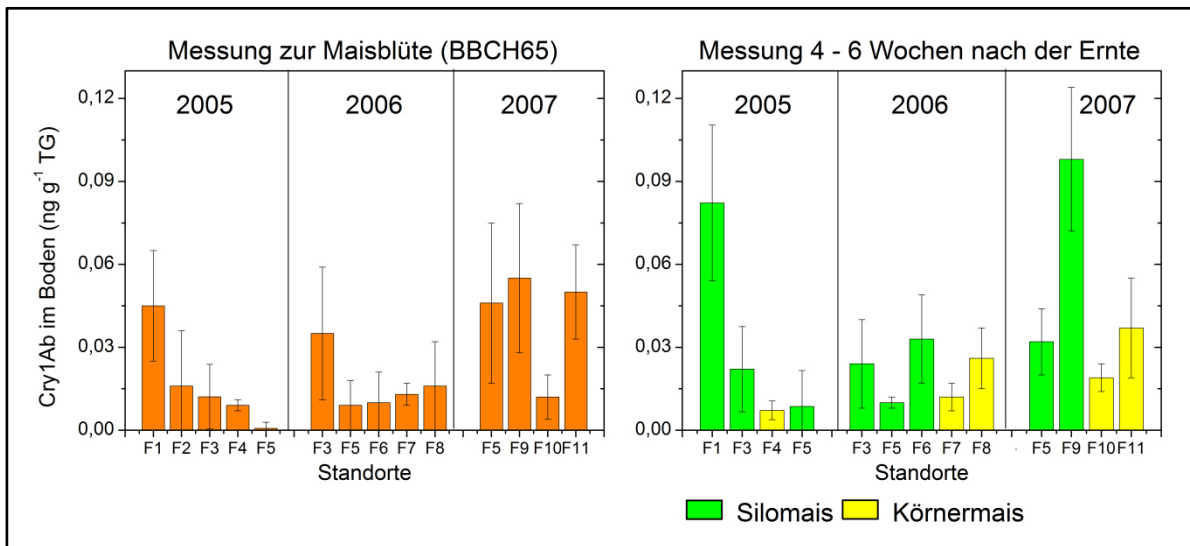


Abbildung 3: Cry1Ab-Gehalte im wurzelfreien Boden in den Jahren 2005 - 2007 während der Maisblüte und 4 - 6 Wochen nach der Ernte (Standortbezeichnungen siehe Tabelle 2)

Während der Maisblüte (BBCH65) wurde über die Jahre an den unterschiedlichen Standorten im Mittel $0,02 \text{ ng g}^{-1}$ Cry1Ab im wurzelfreien Boden gemessen. Die Cry1Ab-Gehalte der einzelnen Felder schwankten zwischen 0 ng g^{-1} bis $0,046 \text{ ng g}^{-1}$.

Nach der Ernte lag der Cry1Ab-Gehalt im wurzelfreien Boden im Mittel mit $0,03 \text{ ng g}^{-1}$ etwas höher, was jedoch auf zwei relativ hohe Einzelwerte von den Standorten F1 im Jahr 2005 und F9 im Jahr 2007 zurückzuführen war. Der Mittelwertvergleich (ANOVA) ergab nur für die Standorte F5⁽⁰⁵⁾, F6 und F9 einen signifikanten Unterschied zwischen den Cry1Ab-Gehalten zur Maisblüte und nach der Ernte. Auf allen anderen Standorten änderte sich der Cry1Ab-Gehalt im Boden zwischen den zwei Zeitpunkten der Probenahme nicht signifikant. Es zeigte sich ebenso kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Maisnutzung (Silo- oder Körnermais) und dem Cry1Ab-Gehalt im wurzelfreien Boden nach der Ernte.

Die Cry1Ab-Gehalte des wurzelfreien Bodens zur Maisblüte zeigten auf der Hälfte der Felder eine starke Streuung zwischen den Punkten der Probenahme und wiesen einzelne Werte als Ausreißer auf. Beim Mittelwertevergleich anhand einer einfaktoriellen ANOVA (Post Hoc Games-Howell-Test) zeigten sich zwischen den Feldmittelwerten signifikante Unterschiede (Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$). Die Cry1Ab-Gehalte der Standorte F2, F3⁽⁰⁶⁾, F5⁽⁰⁷⁾, F8 und F9 zeigten keinen signifikanten Unterschied zu allen anderen Standorten. Die Mittelwerte der Standorte F3⁽⁰⁵⁾, F4, F5⁽⁰⁵⁾, F5⁽⁰⁶⁾, F6, F7 und F10 unterschieden sich signifikant von Standort F1. Der Standort F5⁽⁰⁵⁾ unterschied sich außerdem signifikant von den Standorten F1, F7 und F11.

Die Cry1Ab-Gehalte im wurzelfreien Boden nach der Ernte zeigten tendenziell eine geringere Streuung und weniger Ausreißer als die Messwerte während der Maisblüte. Es zeigten sich ähnliche signifikante Unterschiede zwischen den Feld-Mittelwerten wie bei den Messwerten zur Maisblüte. Die Cry1Ab-Gehalte der Standorte F3⁽⁰⁵⁾, F3⁽⁰⁶⁾, F4, F5⁽⁰⁶⁾, F5⁽⁰⁷⁾, F6, F7, F8, F10 und F11 wiesen genau wie zur Maisblüte keinen statistisch signifikanten Unterschied auf. Der Unterschied des Cry1Ab-Gehaltes des Standortes F1 trat nach der Ernte noch stärker hervor und war nun signifikant gegenüber allen Feldern außer F9 und F11. Der Standort F9 zeigte nach der Ernte nun ebenfalls einen signifikanten Unterschied gegenüber allen Feldern außer F1, F11, F6 und F5⁽⁰⁷⁾.

3.3.3.2 Cry1Ab-Gehalt im Rhizosphärenboden

Die in den Jahren 2005 bis 2007 ermittelten Cry1Ab-Gehalte im Rhizosphärenboden während der Maisblüte sowie 4 - 6 Wochen nach der Ernte sind in Abbildung 4 als Feldmittelwerte dargestellt. Die Messung im Rhizosphärenboden nach der Ernte war nur an den Standorten möglich, an denen bis zum Messzeitpunkt noch keine Bodenbearbeitung stattgefunden hatte und sich die Wurzelballen somit noch intakt im Boden befanden.

Der Cry1Ab-Gehalt des Rhizosphärenbodens lag während der Maisblüte im Mittel bei $0,26 \text{ ng g}^{-1}$. Dies ist etwa 10-mal mehr als im wurzelfreien Boden zur Maisblüte gemessen wurde (siehe Abbildung 3). Ebenso wie im wurzelfreien Boden zeigten sich große Unterschiede zwischen den einzelnen Standorten. Der minimal gemessene Cry1Ab-Gehalt im Rhizosphärenboden zu Maisblüte betrug $0,02 \text{ ng g}^{-1}$, lag also im Bereich des durchschnittlichen Gehaltes im wurzelfreien Boden, und der maximal gemessene Wert betrug $1,4 \text{ ng g}^{-1}$.

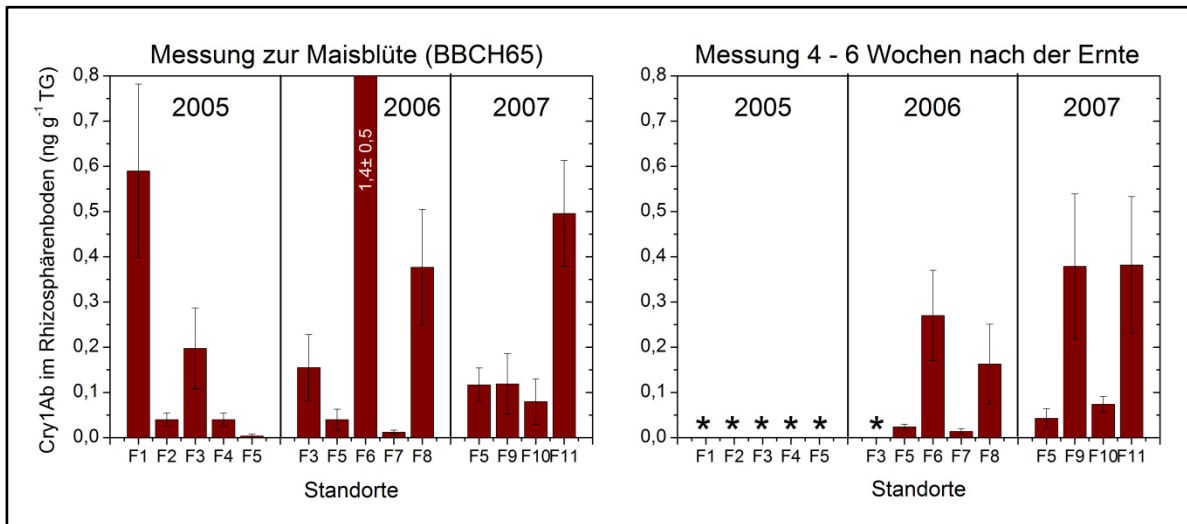


Abbildung 4: Cry1Ab-Gehalte im Rhizosphärenboden der untersuchten Freilandstandorte zur Maisblüte sowie 4 - 6 Wochen nach der Ernte in den Jahren 2005 – 2007 (* - kein Cry1Ab detektiert)

Nach der Ernte wurde durchschnittlich $0,16 \text{ ng g}^{-1}$ Cry1Ab, mit minimal $0,02 \text{ ng g}^{-1}$ und maximal $0,38 \text{ ng g}^{-1}$ im „Rhizosphären“-Boden gemessen. Da die Wurzeln nach dem Schnitt der oberirdischen Pflanzenteile nicht mehr ihre natürliche Funktion zur Versorgung der gesamten Pflanzen ausüben konnten, handelte es sich streng genommen nicht mehr um Rhizosphärenboden, sondern um Boden an unterirdischen Pflanzenresten. Der Cry1Ab-Gehalt im anhaftenden Boden hatte sich im Vergleich zur Maisblüte um durchschnittlich 37 % reduziert. Andererseits waren die Wurzeln nicht sofort biologisch inaktiv, was an der häufig auftretenden Bildung oberirdischer Seitentriebe sichtbar wurde. Am Standort F9 wurde nach der Ernte dementsprechend sogar etwa 4-mal mehr Cry1Ab im Rhizosphärenboden gemessen, als zur Maisblüte.

Die Ergebnisse des Mittelwertevergleiches (einfaktorielle ANOVA, Post hoc Games-Howell-Test) ergaben signifikante Unterschiede zwischen den Standorten, jedoch nicht zwischen Einzelproben der gleichen Standorte aus unterschiedlichen Jahren, außer zwischen $F5^{(05)}$ und $F5^{(07)}$. Der Cry1Ab-Gehalt im Rhizosphärenboden von Standort F1 unterschied sich signifikant von allen Feldern außer F6, F8 und F11. Standort $F3^{(05)}$ unterschied sich signifikant von den Standorten F1, F2, F4, $F5^{(05)}$, $F5^{(06)}$, F7 und F11. Die Standorte $F5^{(05)}$ und F7 unterschieden sich signifikant von den Standorten F1, F4, F6, F11, F8, $F3^{(05)}$ und $F5^{(07)}$. Der Standort F4 zeigte einen signifikanten Unterschied zu den Standorten F1, $F3^{(05)}$, $F5^{(05)}$, F6, F7 und F11. Der Cry1Ab-Gehalt am Standort F6 erreichte einen deutlich höheren Wert als bei allen anderen Feldern. Grund dafür könnten im Rhizosphärenboden enthaltene Cry1Ab-haltige Feinwurzeln sein, die das Messergebnis beeinflussten. Die Feinwurzeln waren aus dem Boden F6 besonders schwer zu entfernen,

da es sich um einen tonigen Lehm handelte, der aufgrund von Niederschlag zum Zeitpunkt der Probenahme stark zusammenklebte.

Im Rhizosphärenboden nach der Ernte unterschieden sich die Standorte F5⁽⁰⁶⁾ und F7 statistisch signifikant von den Standorten F6 und F10. Die restlichen Standorte F5⁽⁰⁷⁾, F8, F9, und F11 besaßen keinen signifikanten Unterschied zu den anderen Standorten.

3.3.3.3 Cry1Ab-Gehalt in den Maiswurzeln

Von den Freilandstandorten wurden in den Jahren 2005 - 2007 parallel zu den Bodenproben auch Maiswurzeln während der Maisblüte sowie 4 - 6 Wochen nach der Ernte entnommen und deren Cry1Ab Gehalte bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5 dargestellt.

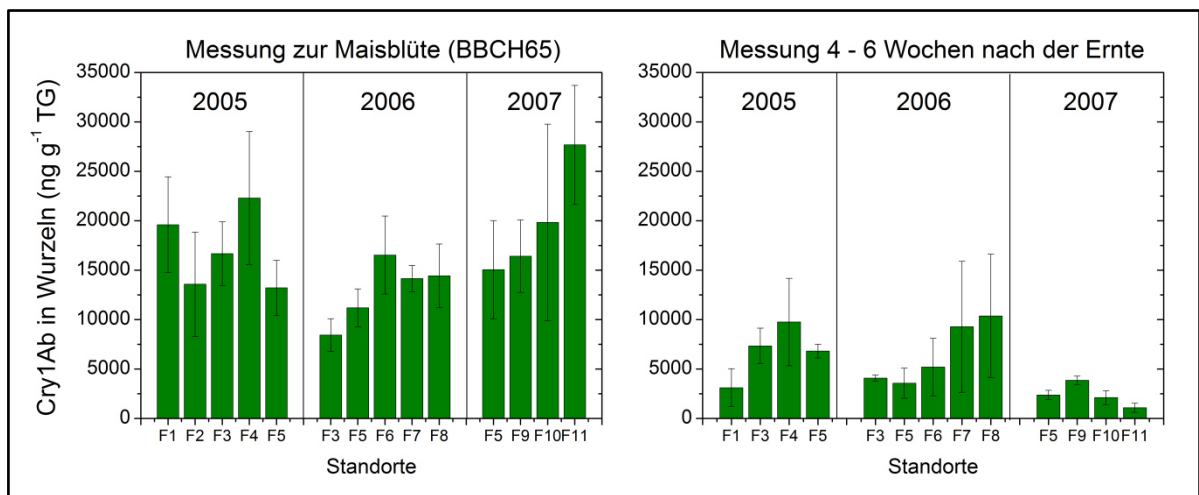


Abbildung 5: Cry1Ab-Gehalte in Maiswurzeln zur Maisblüte sowie 4 - 6 Wochen nach der Ernte in den Jahren 2005 - 2006 auf den untersuchten Freilandstandorten

In den Maiswurzeln wurden zur Maisblüte (BBCH65) im Mittel $16,4 \mu\text{g g}^{-1}$ Cry1Ab gemessen. Die Cry1Ab-Gehalte in den Maiswurzeln lagen demnach, bezogen auf das Trockengewicht, etwa 60.000 mal höher als im Rhizosphärenboden und etwa 700.000 mal höher als im wurzelfreien Boden zur gleichen Zeit. Nach der Ernte waren in den Maiswurzeln noch durchschnittlich $5,3 \mu\text{g g}^{-1}$ Cry1Ab enthalten. Nach 1,5 Monaten hatte sich der Cry1Ab-Anteil in den Wurzeln demnach bereits um durchschnittlich 70 % reduziert.

Die statistische Verteilung der Messwerte der jeweiligen Standorte zeigte auf den Feldern F1, F2, F4, F5⁽⁰⁷⁾, F10 und F11 eine deutlich höhere Streuung als auf den restlichen Feldern. Dabei wurden jedoch keine Unterschiede zwischen den Maissorten beobachtet.

Der Mittelwertvergleich innerhalb der Jahre zeigte, dass es zwischen den Mittelwerten Unterschiede gab, diese jedoch auf dem Niveau $\alpha = 0,05$ nicht signifikant waren. Beim Vergleich zwischen allen Standorten zeigte Feld F3⁽⁰⁶⁾ signifikante Unterschiede zu den Feldern F1, F3, F4 sowie F11 und F11 unterschied sich zudem signifikant von F5⁽⁰⁵⁾, F5⁽⁰⁶⁾ und F7. Das heißt, die Expression variierte vereinzelt stark, war aber unabhängig vom Standort.

Nach der Ernte verblieben die Maiswurzeln oder auch die ganze Maispflanze auf dem Feld. Nach etwa 4 - 6 Wochen waren die Pflanzenteile auf den einzelnen Feldern, abhängig von ihrer Lage in oder auf dem Boden, der Sonneneinstrahlung, Feuchteeinwirkung und Temperaturschwankungen, in verschiedenen Degradationsstadien. So begannen sich z.B. einige Wurzeln bereits zu zersetzen, wogegen andere Wurzeln noch neue Triebe ausbildeten. Dadurch kam es zu Unterschieden im Cry1Ab-Gehalt zwischen den einzelnen Wurzeln.

Beim Mittelwertvergleich (einfaktorielle ANOVA, Post Hoc Games-Howell-Test) ergaben sich signifikante Unterschiede, zwischen den Standorten F1, F3⁽⁰⁵⁾ und F5⁽⁰⁷⁾ sowie zwischen F5⁽⁰⁷⁾ und den Standorten F4 und F5⁽⁰⁵⁾. Alle anderen Standorte unterschieden sich statistisch nicht signifikant untereinander. Wurden die Mittelwerte in den einzelnen Jahren verglichen zeigte sich, dass sich die Mittelwerte in den Jahren zwar unterschieden, jedoch auf dem Niveau 0,05 nicht signifikant waren.

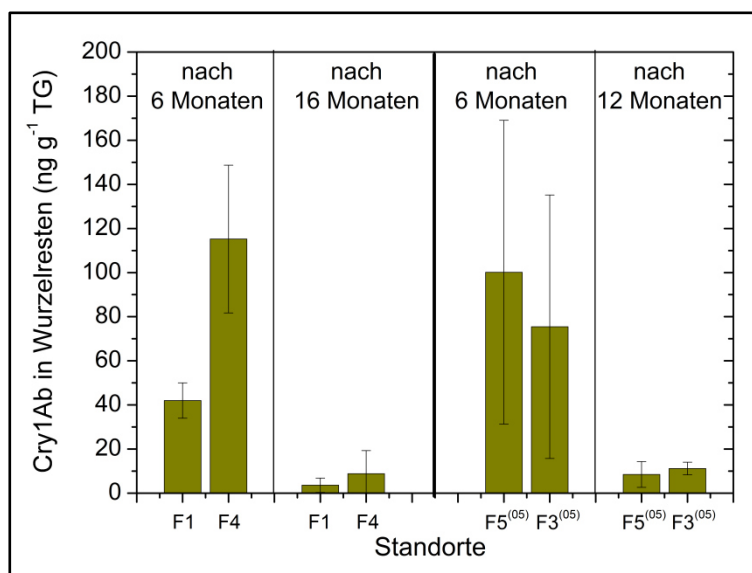


Abbildung 6: Cry1Ab-Gehalt in Wurzelresten von den Freilandstandorten F1, F4, F3⁽⁰⁵⁾ und F5⁽⁰⁵⁾ sechs Monate sowie zwölf bzw. sechzehn Monate nach der Ernte

Zusätzlich zu den o.g. Probenahmezeitpunkten war es an den Standorten F1, F4, F5⁽⁰⁵⁾ und F3⁽⁰⁵⁾ möglich, die Entwicklung des Cry1Ab-Gehaltes in den auf dem Feld verbliebenen Wurzelresten bis zu 16 Monaten nach der Ernte zu verfolgen (siehe Abbildung 6). Etwa sechs Monate nach der Ernte enthielten die auf dem Feld verbliebenen Wurzelreste noch durchschnittlich 42 bis 115 ng g⁻¹ Cry1Ab. Das sind noch 0,3 bis 0,7 % der ursprünglich enthaltenen Cry1Ab-Menge was einem Abbau von 99 % entsprach. Nach etwa einem Jahr enthielten die Wurzelreste noch durchschnittlich 3 bis 10 ng g⁻¹ Cry1Ab, was gegenüber der intakten Wurzel einer Abnahme von über 99,9 % entsprach.

3.3.3.4 Cry1Ab-Gehalt im wurzelfreien Boden aus unterschiedlichen Bodentiefen

An den Standorten F1, F3, F5, F6, F7, F8 und F9 wurden 4 - 6 Wochen nach der Ernte, zum Zeitpunkt des höchsten Cry1Ab-Eintrags in den Boden, die Cry1Ab-Gehalte in verschiedenen Bodentiefen ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 7 dargestellt.

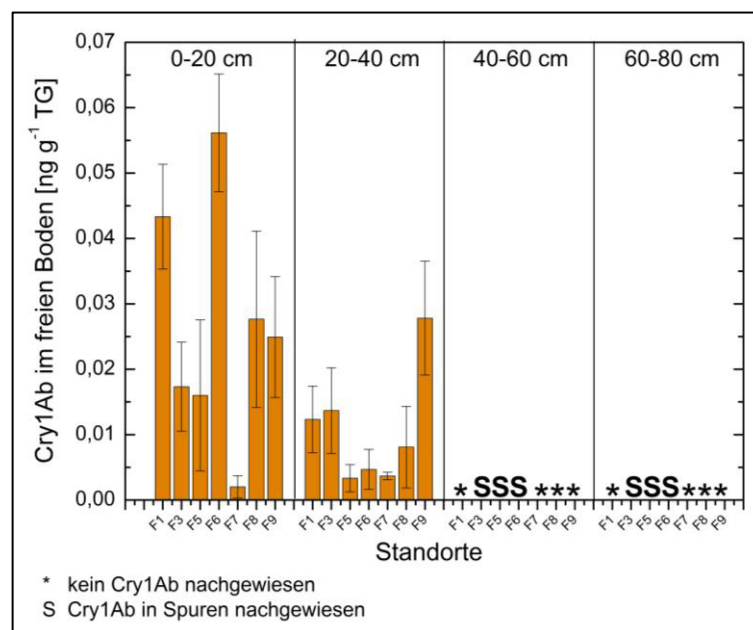


Abbildung 7: Cry1Ab-Gehalt im wurzelfreien Boden in verschiedenen Bodentiefen

In der obersten Bodenschicht von 0 - 20 cm, die etwa dem Pflughorizont entsprach, wurden durchschnittlich 0,03 ng g⁻¹ Cry1Ab gemessen (vgl. auch Abbildung 3). Im darunter liegenden Bodenbereich in der Tiefe von 20 - 40 cm wurden Cry1Ab-Gehalte nachgewiesen, die außer bei Standort F9 bereits alle unter dem statistischen Detektionslimit von 0,02 ng g⁻¹ lagen. Mit einem Mittelwert von 0,01 ng g⁻¹ wurden hier 60 % niedrigere Cry1Ab-Gehalte gemessen. Die Unterschiede zwischen den beiden

oberen Bodentiefen waren signifikant. In einer Tiefe von 40 - 60 cm und 60 - 80 cm wurde an den meisten Standorten kein Cry1Ab mehr und auf einigen Standorten wurden noch Spuren (Konzentrationen die sich signifikant von Null unterscheiden) nachgewiesen. Eine deutliche Verlagerung von Cry1Ab in tiefere Bodenschichten wurde nicht ermittelt.

3.3.3.5 Überdauerung von Cry1Ab-Gehalten im Freilandboden

An insgesamt neun Standorten (F1, F3⁽⁰⁵⁾, F3⁽⁰⁶⁾, F4, F5⁽⁰⁵⁾, F5⁽⁰⁶⁾, F6, F7, F8) wurde der Cry1Ab-Gehalt im wurzelfreien Boden bis 15 Monate nach der Ernte verfolgt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 8 dargestellt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Cry1Ab-Gehalte des wurzelfreien Bodens zur Maisblüte und nach der Ernte nochmals mit aufgetragen (vgl. Abbildung 3).

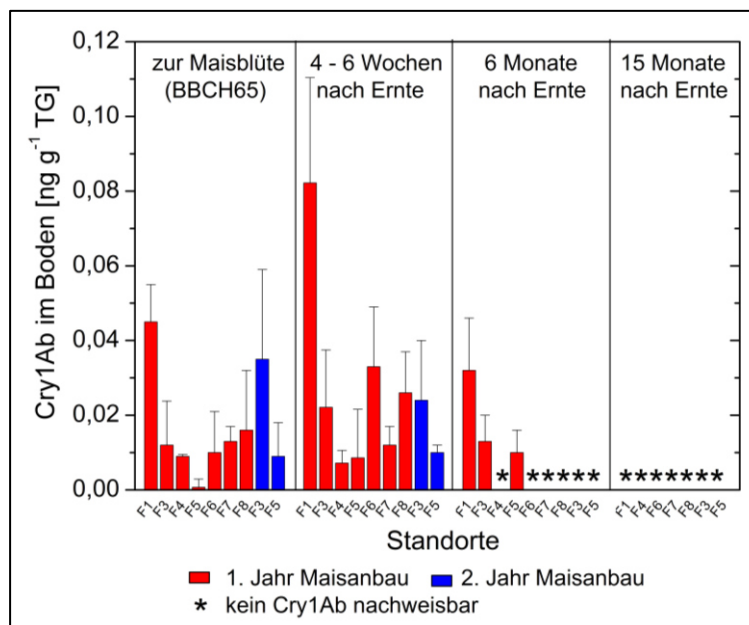


Abbildung 8: Cry1Ab-Gehalt im wurzelfreien Boden im Zeitraum von der Maisblüte bis 15 Monate nach der Ernte

Etwa 4 bis 6 Wochen nach der Ernte lag der Cry1Ab-Gehalt des wurzelfreien Bodens an fast allen Standorten höher als zur Maisblüte. Der Unterschied dieser Mittelwerte war jedoch statistisch nicht signifikant (T-Test). Nach einem halben Jahr wurde auf sechs der neun Standorte kein Cry1Ab mehr detektiert, auf den anderen Feldern wurden noch geringe Cry1Ab Konzentrationen von durchschnittlich $0,014 \text{ ng g}^{-1}$ gemessen. Fünfzehn Monate nach der Ernte wurde auf keinem Standort mehr Cry1Ab nachgewiesen.

3.3.3.6 Abschätzung der Cry1Ab-Gesamteintragsmengen in den Freilandboden

Der Haupteintrag von Cry1Ab in den Boden im Freiland erfolgte nach der Ernte durch auf dem Feld verbliebene Cry1Ab-haltige Maispflanzenreste. Die Menge dieser Pflanzenreste war dabei abhängig von der Maisnutzung (Silomais, Körnermais; vgl. Kapitel 1, Abschnitt 3.2.4). Die Cry1Ab-Gesamteintragsmengen in den Freilandboden wurden deshalb für beide Nutzungsvarianten, anhand von Durchschnittswerten für die Bepflanzungsdichte der Maisfelder und der Cry1Ab-Gehalte in den Maispflanzen abgeschätzt. In Tabelle 3 sind die zur Abschätzung benötigten Parameter sowie die sich daraus ergebenden Cry1Ab-Eintragsmengen dargestellt.

Tabelle 3: Parameter zur Abschätzung des Cry1Ab-Eintrages in den Freilandboden sowie die sich ergebenden maximalen Cry1Ab-Eintragsmengen, abhängig von der Maisnutzung

Maisnutzung	Silomais	Körnermais
Bepflanzungsdichte [Pflanzen m ⁻²]	18 ± 3	
mittleres Gewicht der Maiswurzel [kg]	0,4 ± 0,2 FW	
mittlerer Cry1Ab-Gehalt der Wurzel [µg g ⁻¹]	2,2 ± 0,4 FW	
mittleres Gewicht der Maispflanze ohne Wurzel [kg]	-	1,1 ± 0,6 FW
mittlerer Cry1Ab-Gehalt der Maispflanze [µg g ⁻¹]	-	6,03 FW*
resultierender maximaler Cry1Ab-Eintrag [g m ⁻²]	0,02	0,13

*[Nguyen & Jehle, 2007]

Auf den untersuchten Standorten wurde eine durchschnittliche Bepflanzungsdichte von 18 ± 3 Maispflanzen pro Quadratmeter ermittelt. Das durchschnittliche Gewicht einer Maiswurzel lag nach eigenen Bestimmungen bei 0,4 ± 0,2 kg und das einer Maispflanze ohne Wurzel bei 1,1 ± 0,6 kg. Der mittlere Cry1Ab-Gehalt in den Maiswurzeln betrug, wie in Kapitel 1, Abschnitt 3.3.3 bereits dargestellt, 2,2 ± 0,4 µg g⁻¹. Der Mittelwert für den Cry1Ab-Gehalt einer Maispflanze wurde mit 6,03 µg g⁻¹ von Nguyen & Jehle (2007) übernommen. Aus diesen Parametern ergab sich ein durchschnittlicher Cry1Ab-Eintrag bei Körnermais von 1,3 kg ha⁻¹ und bei Silomais von 0,2 kg ha⁻¹.

3.3.4 Physikochemische Bodeneigenschaften

Für die Böden der Standorte F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7, F8, F9, F10 und F11 wurden die physikochemischen Bodenparameter (pH-Wert, Wasserhaltekapazität, Kationenaustauschkapazität, Kohlenstoffgehalt, Stickstoffgehalt, Biomassekohlenstoffgehalt, Korngrößenverteilung) ermittelt, um anschließend mögliche Zusammenhänge zu den Cry1Ab-

Gehalten zu analysieren. Die Ergebnisse der Bodenanalysen sind in Abbildung 9 dargestellt.

Die pH-Werte in den Böden der meisten Freilandstandorte lagen im Bereich von pH 5,0 bis pH 6,5 und waren damit typisch für Böden unter landwirtschaftlicher Nutzung im norddeutschen Bereich (Scheffer/Schachtschabel, 1998). Abweichungen davon wurden nur an zwei Standorten festgestellt. Standort F11 zeigte einen Boden-pH-Wert von pH 4,6 und Standort F10 von pH 7,5. Die größte Heterogenität bei pH-Werten innerhalb eines Feldes bestanden bei den Standorten F1, F2, F3 und F6. Hier variierte der Wert um im Mittel $\pm 0,4$. Sehr homogene pH-Werte (Schwankungen $\leq \pm 0,1$) wiesen dagegen die Standorte F8, F9, F10 und F11 auf.

Die maximalen Wasserhaltekapazitäten der Bodenproben lagen zwischen 20 und 46 Gew.-%. Besonders homogene Werte mit Schwankungen von $\leq \pm 1$ Gew.-% innerhalb eines Feldes waren an den Standorten F1, F8 und F10 zu finden. Die Messungen an den anderen Standorten zeigten Schwankungen von bis zu ± 4 Gew.-%.

Die ermittelten Werte für die Kationenaustauschkapazität lagen zwischen 9 (F1) und 337 $\text{mmol}_c \text{ kg}^{-1}$ (F2). An den Standorten F1, F3, F6 und F8 wurden Kationenaustauschkapazitäten von $\leq 50 \text{ mmol}_c \text{ kg}^{-1}$ gemessen, an den Standorten F3, F4, F5, F7, F9, F10 und F11 Werte von 160 bis 250 $\text{mmol}_c \text{ kg}^{-1}$. Die Standorte F2, F4 und F7 zeigten mit Schwankungen von bis zu $\pm 50 \text{ mmol}_c \text{ kg}^{-1}$ im Vergleich zu den anderen Standorten (maximal $\pm 17 \text{ mmol}_c \text{ kg}^{-1}$) eine deutlich höhere Heterogenität innerhalb der Felder.

Die Gesamtkohlenstoffgehalte sowie Stickstoffgehalte teilten sich in zwei Bereiche auf. An den Standorten F1, F3, F6 und F8 wurden die niedrigsten Kohlenstoffgehalte (0,7 bis 0,8 Gew.-%) und Stickstoffgehalte (0,06 bis 0,09 Gew.-%) mit den geringsten Schwankungen gemessen. Die Messwerte der restlichen Standorte lagen im gleichen Bereich von 2,2 bis 2,8 Gew.-% für Kohlenstoff und 0,18 bis 0,29 Gew.-% für Stickstoff mit im Mittel 4-fach größeren Schwankungen. Das C/N-Verhältnis lag bei allen Feldern zwischen 10 und 12.

Der Biomassekohlenstoffgehalt wurde parallel zu den Cry1Ab-Messungen im Rhizosphärenboden zur Maisblüte sowie im wurzelfreien Boden 4 - 6 Wochen nach der Ernte ermittelt. Durch die Einarbeitung von Pflanzenresten in den Boden nach der Ernte ergaben sich Änderungen im Biomassekohlenstoffgehalt, die bei der Korrelationsprüfung zum Cry1Ab-Gehalt berücksichtigt werden mussten.

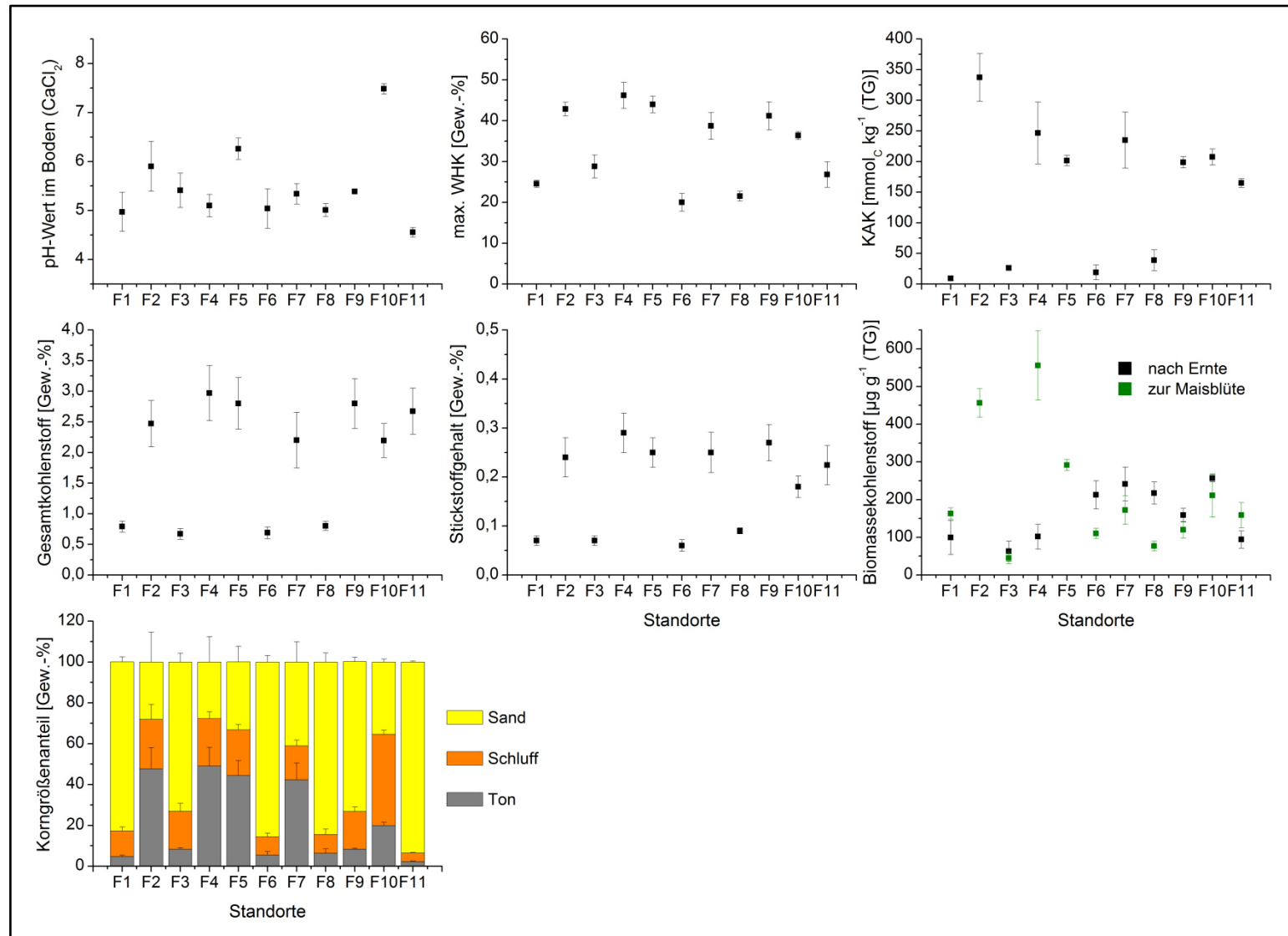


Abbildung 9:
Graphische Darstellung
der physiko-
chemischen Boden-
parameter der Böden
an den Freiland-
standorten F1, F2, F3,
F4, F5, F6, F7, F8, F9,
F10, F11; gemessen zur
Maisblüte (pH-Wert,
maximale Wasser-
haltekapazität,
Kationenaustausch-
kapazität, Gesamt-
kohlenstoffgehalt,
Stickstoffgehalt, Bio-
massekohlenstoff)

Die Biomassekohlenstoffgehalte in den Böden der untersuchten Felder lagen zu beiden Messzeitpunkten im Bereich von 50 (F5) bis 300 (F3) $\mu\text{g g}^{-1}$ (TG). An den Standorten F1 und F11 wurden zur Maisblüte im Mittel 60 $\mu\text{g g}^{-1}$ höhere Biomassekohlenstoffgehalte, als nach der Ernte gemessen. An den Standorten F3, F6, F7, F8, F9, F10 lagen die Messwerte nach der Ernte um im Mittel 70 $\mu\text{g g}^{-1}$ höher als zur Maisblüte. An den Standorten F2 und F5 konnten aus technischen Gründen nur zur Maisblüte Messungen vorgenommen werden. Die Messwerte zur Maisblüte an den Standorten F2 und F4 lagen im Mittel mehr als 3-mal höher (500 $\mu\text{g g}^{-1}$) als der Durchschnittswert der restlichen Standorte (150 $\mu\text{g g}^{-1}$). Möglicherweise handelte es sich dabei um einen Gerätemessfehler. Diese unerklärlichen Messabweichungen wurden deshalb nicht in die folgenden Korrelationsanalysen einbezogen.

Von allen Standorten wurden aus den Anteilen der Kornfraktionen Ton, Schluff und Sand die Bodenarten ermittelt. In Tabelle 4 sind die Bodenarten, welche sich aus den Kornfraktionsanteilen (Abbildung 9) ergaben aufgeführt. Das Bodenartenspektrum der Standorte reichte von reinem Sand an Standort F11 bis zu lehmigem Ton an den Standorten F2 und F4. Dazwischen fand sich schwach schluffiger Sand an Standort F1, mittel lehmiger Sand an den Standorten F3 und F9, schwach toniger Sand an den Standorten F6 und F8, sandig-toniger Lehm an den Standorten F5 und F7 sowie schwach sandiger Lehm an Standort F10.

Tabelle 4: Bodenarten der Untersuchungsstandorte

Standorte	Feldbezeichnung	Bodenart-Kurzzeichen*	Bodenartenuntergruppe*
Alt Zeschdorf	F1	Su2	schwach schluffiger Sand
Altlangsow	F2	TI	lehmiger Ton
Groß Lüsewitz	F3	SI3	mittel lehmiger Sand
Gusow	F4	TI	lehmiger Ton
Wendhausen	F5	Lts	sandig-toniger Lehm
Mallnow	F6	St2	schwach toniger Sand
Altlangsow	F7	Lts	sandig-toniger Lehm
Hohenstein	F8	St2	schwach toniger Sand
Groß Lüsewitz	F9	SI3	mittel lehmiger Sand
Wulfen	F10	Ls2	schwach sandiger Lehm
Mügeln	F11	Ss	reiner Sand

*Bodenkundliche Kartieranleitung (1994), Tabelle 26

Beim Vergleich der Messwerte aller bodenphysikalischen bzw. chemischen Parameter zeigten sich für den Parameter Kationenaustauschkapazität die größten Schwankungen und für die Wasserhaltekapazität sowie den Boden-pH-Wert die niedrigsten. Die Stärke

der Streuung der Parameter, die voneinander abhängig waren (z.B. Kationenaustauschkapazität, Wasserhaltekapazität, Tongehalt), war jedoch nicht standortspezifisch. Somit ist keine sichere Aussage über die räumliche Heterogenität innerhalb der jeweiligen Standorte (Felder) möglich.

3.3.5 Korrelation zwischen Cry1Ab-Gehalten in den Rhizosphärenböden und den physikochemischen Bodenparametern

Zwischen den Cry1Ab-Gehalten in den Bodenproben aus den Maisrhizosphären, wie sie zum Blütezeitpunkt (BBCH65) bestimmt worden waren, und den physikochemischen Bodenparametern wurden die Abhängigkeiten mit Hilfe des Spearman'schen Rangkorrelationskoeffizienten (Spearman's Rho) überprüft. Die Signifikanz wurde zweiseitig getestet auf dem Signifikanzniveau $\alpha = 0,01$. Die Messdaten mit den zugehörigen Korrelationskoeffizienten sind in Abbildung 10 dargestellt.

Der Cry1Ab-Gehalt korrelierte hoch signifikant ($p \leq 0,001$) negativ mit den Bodenparametern Wasserhaltekapazität, Kationenaustauschkapazität, Gesamtkohlenstoffgehalt, Stickstoffgehalt sowie den Korngrößenfraktionen Schluff und Ton. Zur Korngrößenfraktion Sand zeigte sich entsprechend eine hoch signifikante positive Korrelation. Weitere positive Korrelationen wurden nicht ermittelt.

Weiterhin ergab sich eine negative Korrelation zum Biomassekohlenstoffgehalt des Bodens, jedoch mit einem geringeren Signifikanzwert von $p = 0,007$. Für den Boden-pH-Wert zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang ($p = 0,082$) zum Cry1Ab-Gehalt im Boden. Die stärkste Korrelation zu den Cry1Ab Gehalten mit einem Korrelationskoeffizienten von $-0,759$ wurde für den Tongehalt ermittelt.

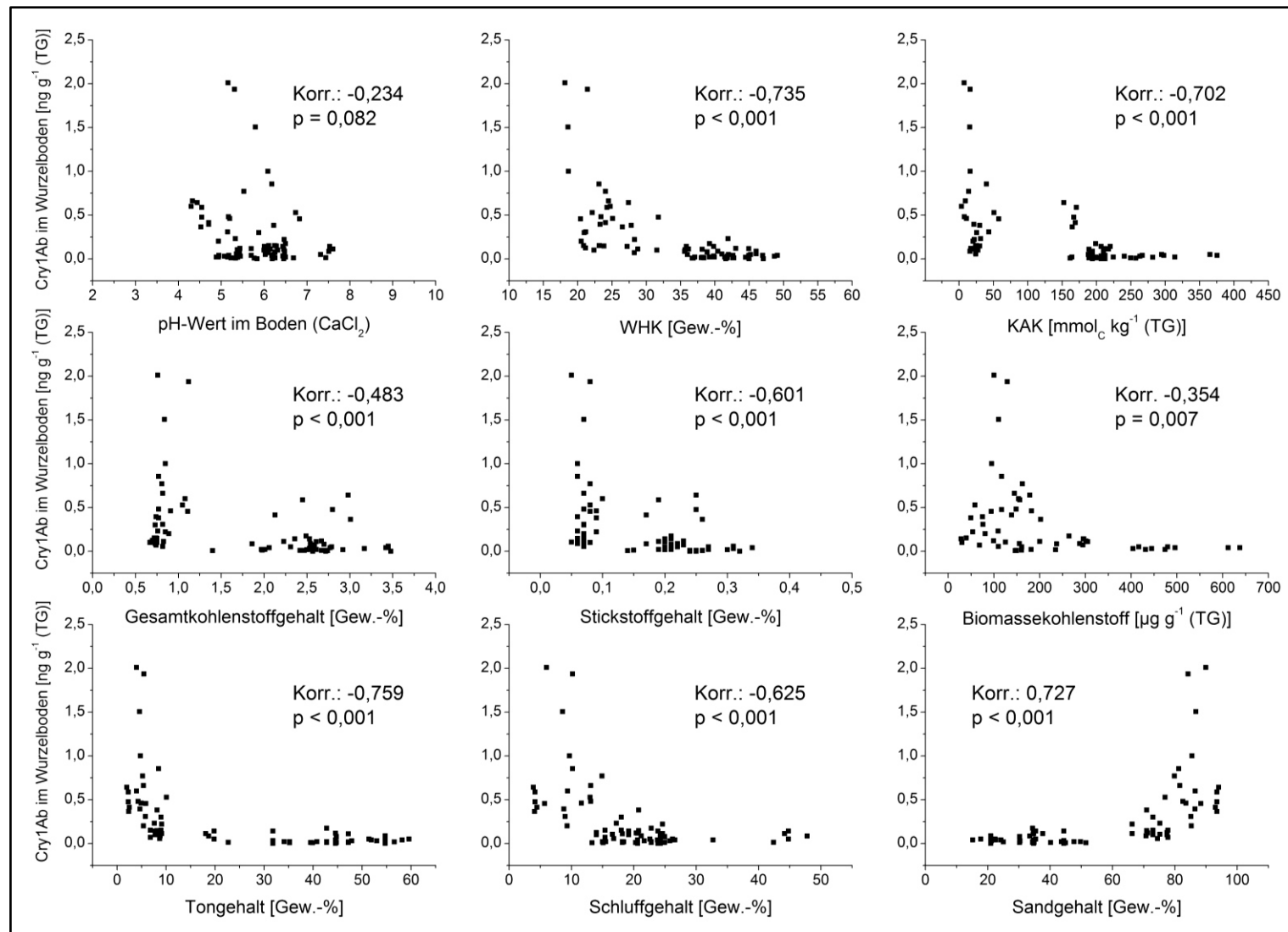


Abbildung 10:
Korrelationen zwischen
Cry1Ab-Gehalt im Rhizo-
sphärenboden und phy-
sikochemischen Boden-
parametern

3.3.6 Korrelation zwischen den Cry1Ab-Gehalten im wurzelfreien Boden und physikochemischen Bodenparametern

Der Zusammenhang zwischen Cry1Ab-Gehalt im wurzelfreien Boden und den physikochemischen Bodenparametern wurde analog zur Korrelation im Rhizosphärenboden überprüft. Die Messdaten mit den zugehörigen Korrelationskoeffizienten sind in Abbildung 11 dargestellt.

Beim Cry1Ab-Gehalt im wurzelfreien Boden zeigten sich weniger starke Zusammenhänge als im Rhizosphärenboden. Hoch signifikante Korrelationen ($p \leq 0,001$) wurden nur bei den Korngrößenfraktionen Ton und Sand ermittelt. Dabei korrelierte der Tonanteil negativ und der Sandanteil entsprechend positiv mit den Cry1Ab-Gehalten im wurzelfreien Boden. Im Gegensatz zum Rhizosphärenboden wurde jedoch auch eine signifikante Korrelation zum Boden-pH-Wert mit $p = 0,002$ ermittelt. Je höher der Boden-pH-Wert im Bereich von pH 4 bis pH 8 umso niedriger war der Cry1Ab Gehalt. Bei den Parametern Gesamtkohlenstoffgehalt, Stickstoffgehalt und Schluffanteil zeigten sich nur auf dem Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ signifikante Zusammenhänge. Für die Parameter Wasserhaltekapazität und Biomassekohlenstoffgehalt wurden keine signifikanten Korrelationen ermittelt. Die höchste Korrelation mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,457 ergab sich beim wurzelfreien Boden für den Korngrößenparameter Sand.

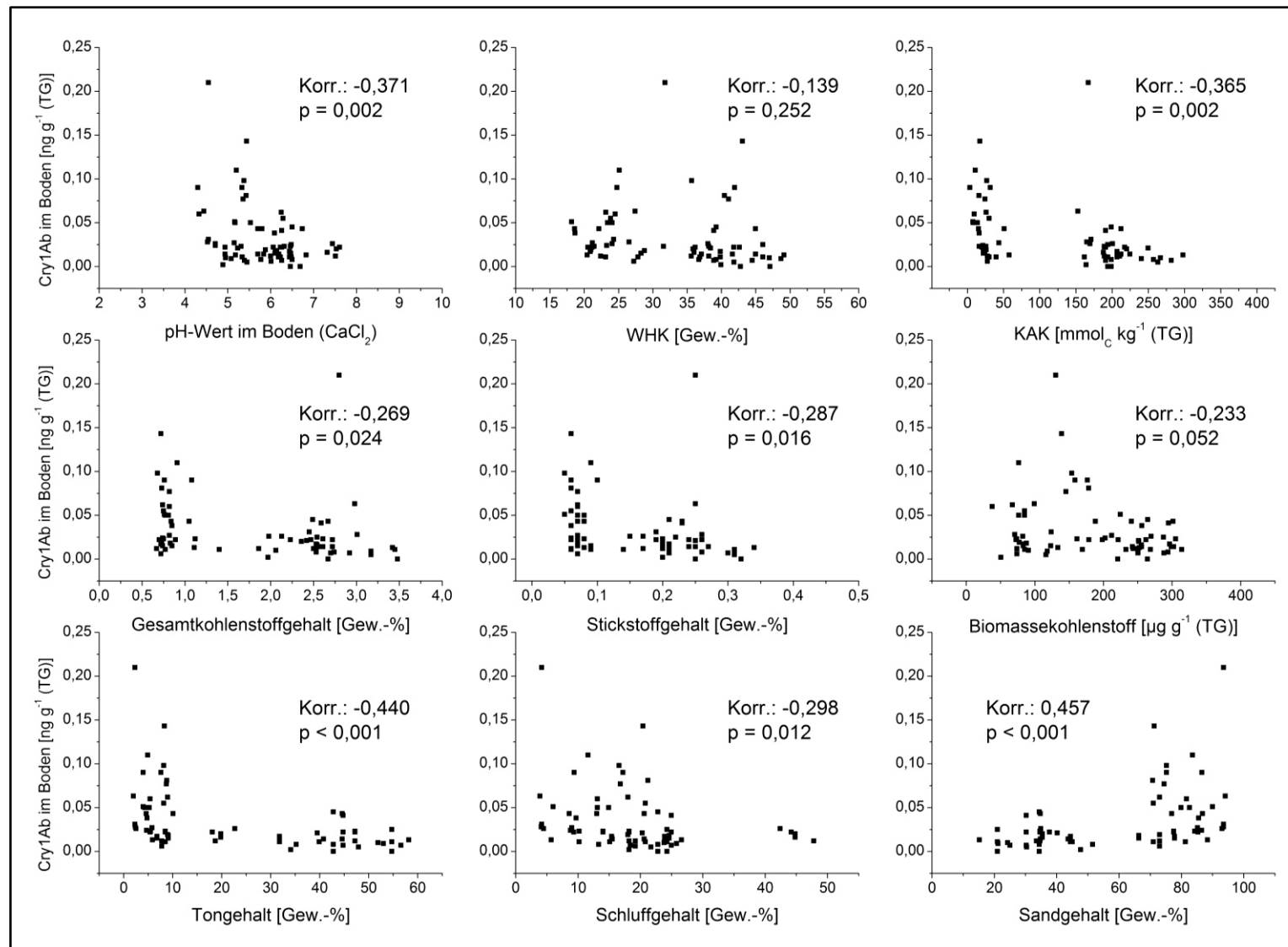


Abbildung 11:
Korrelationen zwischen
Cry1Ab-Gehalt im
wurzelfreien Boden und
physikochemischen
Bodenparametern

3.4 Diskussion

Proteine sind für viele Mikroorganismen, wie sie auch im Boden leben, eine wichtige Energie-, Kohlenstoff- und Stickstoffquelle. Dies erklärt sich schon daraus, dass ein bedeutender Anteil der Primärproduktion, also der pflanzlichen Biomasse, die in den Boden gelangt, aus Proteinen besteht (Gisi *et al.*, 1997). Im Allgemeinen gelten Proteine im Boden auf Grund dieses hohen mikrobiellen Potenzials als leicht abbaubar und dies sollte prinzipiell auch für das Cry1Ab Protein aus MON810-BT-Mais gelten. Tatsächlich zeigten Untersuchungen von Koskella & Stotzky (1997) dass Mikroorganismen in Lösungen Cry1Ab gut abbauen können. Im Boden können Proteine, wie auch deren Bausteine, die L-Aminosäuren, aber an Oberflächen sorbieren. Dies wurde z.B. von Vieublé Gonod *et al.* (2006) für Leucin und Lysin oder auch von Wang *et al.* (2008) für Cry1Ab gezeigt. Die Sorptionsprozesse erfolgen häufig durch elektrostatische Wechselwirkungen (Kleijn & Norde, 1995). Tatsächlich ermittelten Sander *et al.* (2010), dass die Adsorption von Cry1Ab hauptsächlich von sog. *patch-controlled electrostatic attraction* bestimmt wird. Sowohl die Bodenbestandteile, wie Ton oder Huminsäuren, haben Ladungen (in der Regel im normalen pH Bereich negativ; Scheffer/Schachtschabel, 1998) als auch die Proteine, die allerdings auch positive Ladungen z.B. an den freien Aminogruppen, tragen können. So haben mehrere Studien gezeigt, dass Cry1Ab-Proteine von Tonpartikeln und Huminsäuren sorbiert werden (Tapp & Stotzky, 1995, 1998; Crecchio & Stotzky, 1998, Zhou *et al.*, 2005). Interessanterweise bleibt dabei offensichtlich ihre insektizide Wirkung jedoch über einen längeren Zeitraum bestehen (Saxena *et al.*, 1999; Vettori *et al.*, 2003), was auf eine hohe strukturelle Stabilität der Proteine hinweist (Sander *et al.*, 2010).

Diese hohe strukturelle Stabilität der Cry1Ab Proteine ist vorteilhaft für deren Quantifizierung aus Bodenextrakten mit ELISA, wie sie in den meisten Untersuchungen zur Persistenz des Cry1Ab im Boden und auch in dieser Arbeit genutzt wurde. In anderen Studien betrugen die Nachweisgrenzen $0,5 \text{ ng g}^{-1}$ (Wang *et al.*, 2006), $0,14 \text{ ng g}^{-1}$ (Nguyen & Jehle, 2007) oder $0,4 \text{ ng g}^{-1}$ Boden (Gruber *et al.*, 2011) und waren damit noch relativ hoch. Um möglichst empfindlich und lange Cry1Ab aus MON810-BT-Mais im Freilandboden verfolgen zu können, wurde hier die Sensitivität der ELISA-Messungen, in Anlehnung an eine vorhergehende Studie (Baumgarte & Tebbe, 2005, 5-fache Aufkonzentration), durch Aufkonzentration um den Faktor 17 erhöht. Diese empfindliche Methode wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals eingesetzt um auf einer größeren räumlichen Skala, d.h. auf repräsentativen landwirtschaftlichen Flächen Nord- und Mitteldeutschlands, Cry1Ab-Gehalte im Boden zu analysieren. Es ist zu beachten, dass die im Test-System verwendeten Antikörper möglicherweise nicht nur mit intakten, sondern auch partial degradierten Proteinen reagieren könnten (Paul *et al.*, 2010). Insofern stellen die

ermittelten Ergebnisse einen Höchstwert für intakte Cry1Ab Proteine dar, bzw. einen Summenwert für intakte und partial degradierte Produkte. Für den quantitativen Nachweis aus Bodenproben ist außerdem noch zu berücksichtigen, dass die o.g. Adsorption die Extraktion des Cry1Ab aus dem Boden erschwert und deshalb nicht vollständig ist. In einem eigenen Vorversuch zur Effizienz des Extraktionsprotokolls wurden aus Kontrollböden der aktuellen Untersuchungsstandorte 87 % des zugesetzten Cry1Ab wiedergefunden. Bleiben die Proteine länger im Boden könnte dies die Extraktionsausbeute möglicherweise noch weiter erniedrigen. Insgesamt ist daher davon auszugehen, dass die hier ermittelten Werte maximal 87 % des tatsächlichen Cry1Ab Gehaltes der Bodenproben zeigten.

Einige Feldstudien zur Persistenz von Cry1Ab im Freiland erfassten den Cry1Ab-Gehalt im Boden indirekt durch biologische Nachweise, sog. Bioassays (Zwahlen *et al.*, 2003; Dubelman *et al.*, 2005). Der Vorteil von Bioassays besteht darin, dass unabhängig von der Sorption die tatsächliche Toxizität der Verbindung für Zielorganismen ermittelt wird, da offensichtlich unabhängig von der Sorption an Bodenpartikel im Darm von Testorganismen die Toxine aktiv werden. Der Nachteil des Bioassays besteht jedoch darin, dass der Nachweis relativ unempfindlich ist, da nur relativ hohe Konzentrationen eine Reaktion hervorrufen. Bei Untersuchungen von Tapp & Stotzky (1998) waren $0,09 \mu\text{g g}^{-1}$ Cry1Ab im Boden notwendig, bei Dubelman *et al.* (2005) waren es $0,03 \mu\text{g g}^{-1}$, Konzentrationen die um das 346-fache bzw. 115-fache über dem lagen, was in den Böden bei den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit maximal auftrat. Aufgrund dieser niedrigen Nachweisempfindlichkeit war daher die Nutzung von Bioassays in den eigenen Untersuchungen für das Monitoring von Cry1Ab in Freilandböden von Feldern mit MON810-BT-Maisanbau nicht zielführend.

3.4.1 Cry1Ab-Gehalte in Pflanzen und Boden im Freiland

Cry1Ab-Gehalte im Boden zur Maisblüte

Immunoreaktives Cry1Ab wurde während der Maisblüte (BBCH65) an allen Standorten im Rhizosphärenboden der BT-Maispflanzen und auch im wurzelfreien Boden nachgewiesen. Der im Mittel 10-fach geringere Cry1Ab-Gehalt im wurzelfreien Boden, war darauf zurückzuführen, dass das Cry1Ab im Freiland während der Wachstumsphase des Maises hauptsächlich über Maiswurzeln in den Boden gelangt, wobei noch umstritten ist, ob die Abgabe in erster Linie durch Exsudation (Saxena *et al.*, 1999, 2002a, 2004; Saxena & Stotzky, 2000, 2001b; Margarit *et al.*, 2008) oder über abgestorbene Wurzelzellen erfolgt

(Prihoda & Coats, 2008; Miethling-Graff *et al.*, 2010). Auch durch herabfallende Pollen kann Cry1Ab in den wurzelfreien Boden eingetragen werden. Der Cry1Ab-Gehalt der MON810-BT-Maispollen ist mit maximal 97 ng g^{-1} (bezogen auf das Frischgewicht; Nguyen & Jehle, 2007) jedoch sehr niedrig, so dass in dem speziellen Fall von MON810 nur geringe Auswirkungen auf den Cry1Ab-Gehalt des wurzelfreien Bodens zu erwarten waren. Anders würde dies bei BT-Maissorten mit hohen Cry-Proteingehalten in den Pollen wie z.B. bei dem Mais TC1507 mit Cry1F, der kurz vor der Zulassung zum Anbau in der EU steht, zu bewerten sein (Mendelsohn *et al.*, 2003). Die Cry1Ab-Gehalte im wurzelfreien Boden von MON810-Feldern unterlagen im Gegensatz zum Rhizosphärenboden innerhalb des jeweiligen Feldes um einer im Mittel 16 % höheren Streuung, was an der zunehmenden Ungenauigkeit der Messungen bei so niedrigen am Detektionslimit von $0,02 \text{ ng g}^{-1}$ liegenden Werten lag.

Cry1Ab-Gehalte im Boden nach der Ernte

Nach der Ernte waren die Cry1Ab-Gehalte im wurzelfreien Boden etwa 1,5-mal höher als zur Maisblüte. Dieser Unterschied war jedoch nur auf drei Standorten statistisch signifikant. Trotzdem wies die statistische Verteilung der Werte mit einer 14 % geringeren Streuung und weniger Ausreißern nun auf eine homogenere Verteilung des Cry1Ab im wurzelfreien Boden hin. Tatsächlich war zum Zeitpunkt der Probenahme eine gleichmäßigere Verteilung des Cry1Ab im Boden zu erwarten, da nach der Ernte der Haupteintrag von Cry1Ab in den Boden durch auf dem Feld verbliebende absterbende Maispflanzenreste erfolgte, welche zudem an allen Standorten durch die landwirtschaftliche Bodenbearbeitung (Eggen oder Tiefpflügen) in den oberen Bodenhorizont (Ap) eingearbeitet wurden. Eine eventuelle Auswirkung der Bodenbearbeitungsart auf den Cry1Ab-Gehalt im Boden konnte in dieser Arbeit jedoch nicht untersucht werden, da die Unterschiede der Böden (siehe folgender Abschnitt) einen möglichen Effekt durch die Bodenbearbeitung überdeckten.

Es wurden zwei BT-Mais Nutzungsvarianten, die sich im Cry1Ab-Eintrag in Böden nach der Ernte deutlich unterscheiden sollten, verglichen, nämlich Silomais ($n = 8$) und Körnermais ($n = 5$). Bei Silomais verblieben im Wesentlichen die unterirdischen Teile der Pflanzen auf dem Feld, beim Körnermais auch erhebliche Anteile der oberirdischen Pflanzenbiomasse. Das entsprach nach eigenen Berechnungen auf den Untersuchungsflächen dieser Arbeit einem maximalen Cry1Ab-Eintrag von etwa $0,2 \text{ kg ha}^{-1}$ bei Silomais und $1,3 \text{ kg ha}^{-1}$ bei Körnermais. Entsprechend dieser Nutzungsunterschiede sollte der Gehalt an Cry1Ab im Boden bei Silomais niedriger sein als bei Körnermais. Der statistische Test (T-Test) zeigte jedoch solche Unterschiede, auch bei zwei bzw. dreijähriger sukzessiver Nutzung nicht.

Daher ist zu vermuten, dass die Cry1Ab-Proteine zum Großteil noch im verrottenden Pflanzenmaterial abgebaut wurden, bevor die Freisetzung in den Boden erfolgte, z.B. durch pflanzeigene Proteasen oder Proteasen aus Bodenpilzen oder Bakterien, die das Pflanzenmaterial während der Verrottung besiedeln (Ottow, 2011; Varma *et al.*, 2008). Die gleiche Vermutung äußerten auch Zwahlen *et al.* (2003) anhand eine Studie zur zeitlichen Entwicklung des Cry1Ab-Gehaltes in BT-Maispflanzenresten (MON810). Unterstützt wird die Annahme zudem durch die Ergebnisse von Hopkins & Gregorich (2004), die einen dreifach schnelleren Abbau des Cry1Ab-Proteins im Vergleich zur Gesamt-Kohlenstoffabnahme beim Degradationsprozess von Maispflanzenresten (wie sie nach der Ernte auf dem Feld anfallen) im Boden nachgewiesen hatten. Dementsprechend würde der Großteil der Cry1Ab Proteine gar nicht die Bodenmatrix erreichen und so die Möglichkeit zur Adsorption an Bodenbestandteile bekommen.

Cry1Ab-Gehalte der Maiswurzeln

In den Wurzeln von MON810 wurden zur Maisblüte Cry1Ab-Gehalte von durchschnittlich $16 \pm 4 \mu\text{g g}^{-1}$ TG ($2,1 \pm 0,5 \mu\text{g g}^{-1}$ Feuchtgewicht) nachgewiesen. Dies entsprach den Cry1Ab-Gehalten, die auch bei Zwahlen *et al.* (2003), Griffiths *et al.* (2005) und Nguyen & Jehle (2007) für verschiedene Sorten des gleichen Events gemessen wurden. Die ermittelten Cry1Ab-Gehalte in den Wurzelresten, sechs und zwölf Monate nach der Ernte, waren ebenfalls mit den Gehalten die in anderen Studien beobachtet wurden, vergleichbar (Hopkins & Gregorich, 2003; Baumgarte & Tebbe, 2005). Die Cry1Ab-Gehalte in den Maiswurzeln zeigten bei den eigenen Untersuchungen zur Maisblüte keine signifikanten Unterschiede zwischen den gleichen oder auch unterschiedlichen MON810-Sorten auf den untersuchten Feldern. Die Standorte hatten offensichtlich keinen starken Einfluss auf die Expression der rekombinanten Cry1Ab Proteine und damit den Schutz vor dem Maiszünsler. Da alle Standorte mit einer gleichen Pflanzendichte (18 ± 3 Pflanzen m^{-2}) mit BT-Mais bewachsen waren kann folglich angenommen werden, dass an allen Standorten bis zur Ernte im Mittel die gleiche bzw. sehr ähnliche Cry1Ab-Mengen durch den BT-Maisanbau in den Boden gelangten. Das heißt, dass die beobachteten Unterschiede in den Cry1Ab-Gehalten des Bodens nicht durch den Mais sondern durch die Böden, inklusive ihrer biologischen Aktivität durch die Mikroorganismen hervorgerufen wurden. Auch in anderen Studien wurden keine signifikanten Unterschiede in der Cry1Ab-Expression in Maiswurzeln von verschiedenen Standorten gefunden (Nguyen & Jehle, 2007; Griffiths *et al.*, 2007), was auf die Umweltstabilität der Expression des MON810 Events in unterschiedlichen Sorten hinweist. Die Wachstumsphasen selber haben, wie in vorhergehenden Untersuchungen von Baumgarte & Tebbe (2005) und Nguyen & Jehle (2007) gezeigt wurde, ebenfalls keinen signifikanten Einfluss auf die Genexpression. Es

kann also davon ausgegangen werden, dass keine deutlich abweichenden Cry1Ab Gehalte in Böden bei anderen Wachstumsstadien des Mais ermittelt worden wären.

Kontrollen

Da es sich bei den vorliegenden Untersuchungen um landwirtschaftliche Felder handelte, standen nicht, wie bei vielen anderen Untersuchungen, z.B. Baumgarte & Tebbe (2005) oder Gruber *et al.* (2009), Kontrollparzellen mit konventionellem Mais zur Verfügung. Allerdings wurden auch in dieser Arbeit Kontroll-Messungen von Bodenproben durchgeführt. Hierbei wurden direkt angrenzende mit konventionellem Mais bebaute Felder genutzt. In keinem Fall wurden Cry1Ab Proteine in Bodenproben außerhalb des eigentlichen BT-Maisfeldes gefunden. Das bedeutet, dass der Nachweis für die gentechnisch veränderten Proteine sehr spezifisch war. In anderen Untersuchungen wurden auch in Kontrollen Cry1Ab Proteine gefunden, was spekulativ mit dem Vorkommen von natürlichen Cry1Ab Varianten aus *Bacillus thuringiensis* erklärt wurde (Margarit *et al.*, 2008). Allerdings könnten positive Nachweise außerhalb von BT-Maisfeldern auch durch Pollenflug verursacht werden (Emberlin *et al.*, 1999; Jones & Newell, 1948), vorausgesetzt dass in den Pollen ausreichende Mengen Cry1Ab gebildet werden. In den eigenen Untersuchungen mit MON810 wurde dies jedoch nicht festgestellt.

3.4.2 Persistenz und Abbau des Cry1Ab-Proteins im Freiland

Die Cry1Ab-Gehalte im wurzelfreien Boden wurden im Rahmen dieser Untersuchungen auch über die Ernte von MON810-BT-Mais hinaus weiterverfolgt, und zwar bis zu zwei Jahre bzw. bis kein Cry1Ab mehr nachweisbar war. Während ein halbes Jahr nach der Ernte, also nach der Winterperiode, noch quantifizierbare Mengen Cry1Ab an drei Standorten gemessen wurden, war nach 15 Monaten, am Ende des Sommers, an keinem Standort mehr Cry1Ab nachweisbar (Detektionslimit bei einmaliger Messung: $0,02 \text{ ng g}^{-1}$). Auch bei Baumgarte & Tebbe (2005) wurde nach dem Winterhalbjahr noch Cry1Ab im wurzelfreien Boden gefunden. Dabei lagen die Cry1Ab-Konzentrationen etwa 10-mal höher als in dieser Arbeit. In anderen Freilandstudien wurde, wahrscheinlich aufgrund von weniger empfindlichen Nachweisgrenzen ($> 0,1 \text{ ng g}^{-1}$ Boden (TG) (Hopkins & Gregorich, 2003; Dubelman *et al.*, 2005; Margarit *et al.*, 2008; Gruber *et al.*, 2009, 2011)), bereits nach dem Winterhalbjahr kein Cry1Ab mehr nachgewiesen. Die Abnahme der Cry1Ab-Gehalte kann durch abiotische Prozesse, wie Sorption, oder durch biologische, wie Abbau durch Bakterien oder Pilze hervorgerufen werden. Dass der mikrobielle Abbau bei der Abnahme der Cry1Ab Proteingehalte in Böden und Pflanzenresten eine große Rolle spielt, wurde in früheren Laboruntersuchungen zum Abbau des Proteins in Pflanzenresten und im Boden bereits beobachtet (Badea *et al.*, 2010; Zwahlen *et al.*,

2003). Ebenso wurde die Adsorption des Cry1Ab an Bodenbestandteile und Tonminerale bereits nachgewiesen (Venkateswerlu & Stotzky, 1992; Tapp & Stotzky, 1998; Pagel-Wieder *et al.*, 2007). Die genaueren Untersuchungen zur Unterscheidung dieser beiden Prozesse in den hier untersuchten Böden erfolgte in Laboruntersuchungen im Kapitel 3 dieser Dissertationsarbeit, bei der erstmals ^{14}C -markierte Cry1Ab Proteine für boden-metabolische Studien als Substrat genutzt wurden.

Die Überdauerung des Cry1Ab im Boden während des Winterhalbjahres hängt wahrscheinlich mit den niedrigeren Temperaturen zusammen, bei denen die biologische Aktivität in Böden herabgesetzt ist. Auch Zwahlen *et al.* (2003) zeigten, dass der verlangsamte Cry1Ab-Abbau in Pflanzenresten im Freiland hauptsächlich auf niedrige Temperaturen während des Winterhalbjahres zurückzuführen war und andere Parameter, wie z.B. Niederschläge keinen nennenswerten Einfluss ausübten. Ebenso wurden in anderen Studien (Hopkins & Gregorich, 2003; Douville *et al.*, 2007; West & Burges, 1982) Hinweise auf einen Temperatureinfluss auf den Abbau von Cry1Ab im Freiland gefunden. Der biologische Abbau ist damit wohl die Hauptursache, warum bisher, trotz der Sorption von Cry1Ab, in keiner Freilandstudie eine längere Überdauerung oder gar Akkumulation des Cry1Ab beobachtet wurde (Margarit *et al.*, 2008; Dubelman *et al.*, 2005, Baumgarte & Tebbe, 2005). Dies trifft auf eine Beobachtungszeit von 3-jährigem Maisanbau in Folge, wie sie hier mit berücksichtigt wurde, ebenso zu wie für längere Zeiträume von bis zu 9 Jahren (Gruber *et al.*, 2011).

Parallel zu den Bodenanalysen wurde die Entwicklung der Cry1Ab-Gehalte in den auf dem Feld verbliebenen BT-Maispflanzenresten untersucht. Es zeigten sich dabei keine signifikanten Unterschiede zwischen den Maissorten oder der Maisnutzung. Wie bereits in anderen Freilandstudien beobachtet, unterlag der Cry1Ab-Gehalt einer schnellen Abnahme. So wurden 4 - 6 Wochen nach der Ernte nur noch durchschnittlich 30 % des ursprünglichen Cry1Ab-Gehaltes gefunden, was mit Messungen von Hopkins & Gregorich (2004) und Zwahlen *et al.* (2003) übereinstimmt, die einen Cry1Ab-Abbau in Maispflanzenresten im Feldversuch nach 30 - 60 Tagen auf 20 - 38 % des Ausgangsgehaltes, bezogen auf das Trockengewicht des Pflanzenmaterials, beobachteten. Nach einem halben Jahr nach der Ernte reduzierte sich der Cry1Ab-Gehalt in den Wurzelresten auf 0,5 %. Auch hier wurden in anderen Freilanduntersuchungen (Zwahlen *et al.*, 2003; Nguyen & Jehle, 2007; Baumgarte & Tebbe, 2005) ähnliche Werte beobachtet, jedoch mit 1 - 14 % des anfänglichen Cry1Ab-Gehaltes in den Maispflanzenresten tendenziell etwas geringerem Abbau. Trotz der anfänglich schnellen Abnahme des Cry1Ab-Gehaltes zeigte sich, dass ein geringer Teil des Cry1Ab in den Pflanzenresten länger überdauerte. So

waren 12 bzw. 16 Monate nach der Ernte an vier Standorten noch Maiswurzelreste mit bis zu 10 ng g^{-1} Cry1Ab (entspricht 0,06 % des Gehaltes einer intakten Pflanze) auffindbar, obwohl zu diesem Zeitpunkt im Boden selber kein Cry1Ab mehr detektiert wurde. Bei Hopkins & Gregorich (2003) wurden zu diesem Zeitpunkt ebenfalls die gleichen Cry1Ab-Gehalte in Maispflanzenresten gemessen. Offensichtlich stellen derartige Pflanzenreste ein dauerhaftes Reservoir für einen geringen Teil der Cry1Ab-Proteine dar, ohne dass eine messbare Freisetzung dieser Proteine in den Boden erfolgt. Dies ist auch für Betrachtungen zu Wechselwirkungen mit den sog. Nicht-Ziel-Organismen zu berücksichtigen, die mit diesem Pflanzenmaterial in Kontakt kommen. Die Cry1Ab-Konzentrationen von 10 ng g^{-1} liegen jedoch weit unterhalb der Werte, für die biologische Wirkungen beschrieben wurden (vgl. unterer Abschnitt in dieser Diskussion). Untersuchungen von Zurbrügg *et al.* (2010) zeigten dementsprechend, dass mit Cry1Ab keine spezifischen Effekte auf Nicht-Ziel-Organismen, die an der Zersetzung des Pflanzenmaterials beteiligt sind, auftraten.

Die Messergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten eine große Übereinstimmung mit den Daten, wie sie an isolierten Freilandstudien erhoben wurden. Im Gegensatz zu diesen Studien wurden hier jedoch 15 echte landwirtschaftliche Felder mit insgesamt vier verschiedenen MON810-BT-Maissorten und unterschiedlichen Maisnutzungen untersucht. Dabei wurde an zwei Standorten zwei Jahre in Folge und an zwei weiteren Standorten drei Jahre in Folge BT-Mais angebaut. Anhand der vorliegenden Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass der Cry1Ab-Gehalt in Boden und Pflanzen während und nach dem BT-Maisanbau nutzungs- und sortenunabhängig ist. Die große Übereinstimmung der im Freiland unter BT-Maisanbau beobachteten Cry1Ab-Gehalte an den eigenen Standorten sowie Standorten anderer Untersuchungen zeigt, dass die vorliegenden Ergebnisse repräsentativ sind und auch an weiteren Standorten zu erwarten wären.

3.4.3 Akkumulation des Cry1Ab im Freilandboden?

Laboruntersuchungen durch Stotzky und Mitarbeiter zeigten mit Hilfe von biologischen Wirkungsstudien (Bioassays), dass Cry1Ab in adsorbiertem Zustand an Tonpartikeln in Böden relativ lange überdauert und dabei bis zu 234 Tage seine Toxizität gegenüber Zielorganismen erhält (Tapp & Stotzky, 1998). Somit lag der Schluss nahe, dass durch derartige Prozesse die Gefahr der Akkumulation des Cry1Ab im Freilandboden bei landwirtschaftlichem Anbau von BT-Pflanzen, insbesondere bei mehrjährigem Anbau in Folge, wie er in der Praxis nicht unüblich ist, besteht (Tabashnik, 1994; Saxena & Stotzky, 2002a; Muchaonyerwa *et al.*, 2004; Stotzky, 2002, 2004). Es muss jedoch berücksichtigt werden,

dass im Labor mit reinem Cry1Ab deutlich höhere Konzentrationen (von bis zu $6,3 \mu\text{g g}^{-1}$ Boden (TG) (Tapp & Stotzky, 1998)) eingesetzt wurden, als sie unter realen Bedingungen vorkommen, wo der Eintrag niedriger ist und in Verbindung mit anderem Pflanzenmaterial erfolgt. In der vorliegenden Arbeit, im Einklang mit anderen Freilandstudien (Margarit *et al.*, 2008; Dubelman *et al.*, 2005; Palm *et al.*, 1996; Head *et al.*, 2002), ergibt sich kein Hinweis auf eine Akkumulation des Cry1Ab-Proteins im Boden. An zwei Standorten wurde BT-Mais zwei Jahre in Folge angebaut. Allerdings wurde durch das angewandte Verfahren möglicherweise nicht das gesamte adsorbierte Cry1Ab Protein aus der Bodenmatrix gelöst. Während des Untersuchungszeitraumes wurde immer Cry1Ab im wurzelfreien Boden nachgewiesen, jedoch wurde keine signifikante Erhöhung der Cry1Ab-Konzentration in aufeinander folgenden Jahren gefunden. Auch auf diesen Feldern war 15 Monate nach der letzten Ernte kein Cry1Ab im wurzelfreien Boden mehr nachweisbar. Icoz *et al.* (2007) wiesen ebenfalls in 4 aufeinanderfolgenden Jahren des BT-Maisanbaus auf einem Feld das Cry1Ab-Protein anhand eines Westernblot mit ImmunoStrips nach, jedoch ohne die genauen Konzentrationen zu quantifizieren. Zusätzlich wurden in der vorliegenden Arbeit Messungen des Cry1Ab-Gehaltes im wurzelfreien Boden an drei Standorten mit dreijährigem BT-Maisanbau ein Jahr nach der Ernte durchgeführt. Auch hier wurde in keinem Fall mehr Cry1Ab nachgewiesen.

3.4.4 Vertikale Verlagerung des Cry1Ab-Proteins im Freilandboden

Im Zeitraum von 4 bis 6 Wochen nach der Ernte wurden die Cry1Ab-Proteingehalte im freien Boden an mehreren Standorten in vier verschiedenen Bodentiefenbereichen ermittelt. Dieser Zeitpunkt wurde ausgewählt, da hier nach vorherigen Untersuchungen (Baumgarte & Tebbe, 2005) die höchsten Cry1Ab Mengen im freien Boden erwartet wurden. Tatsächlich nahmen die Konzentrationen innerhalb der Ackerkrume (Ap-Horizont 0 - 40 cm) mit zunehmender Tiefe deutlich ab. Unterhalb der Ackerkrume wurden in keinem Feld mehr quantifizierbare, jedoch in Einzelfällen noch detektierbare Mengen Cry1Ab im Boden gefunden; an einigen Standorten bis zu einer Tiefe von 80 cm. Saxena *et al.* (2002b) untersuchten in einer Laborstudie die vertikale Verlagerung von Cry1Ab in mit Kaolinit und Montmorillonit versetztem Boden. Dabei wurden allerdings deutlich höhere Cry1Ab-Konzentrationen von $0,8$ bis $3,2 \mu\text{g g}^{-1}$ Boden eingesetzt und das Vorkommen nur semi-quantitativ bestimmt. Die Autoren berichten, dass die Menge des verlagerten Cry1Ab von den Korngrößenanteilen des Bodens sowie der Menge an zugegebenem Cry1Ab abhängig war. Je geringer der Tongehalt, desto beweglicher war das Cry1Ab. Dies deckt sich mit den eigenen Messungen in dieser Arbeit. An zwei von drei Standorten an denen Spuren von Cry1Ab noch in 80 cm Tiefe gefunden wurden, handelte es sich um schwach tonigen Sand. Die Bodenart des dritten Standortes war tonig-sandiger

Lehm. Aufgrund der geringen Konzentration ($< 0,005 \text{ ng g}^{-1}$) des Cry1Ab kann jedoch davon ausgegangen werden, dass die vertikale Verlagerung keine direkten oder indirekten Auswirkungen auf die Funktion des Bodenökosystems hat. Das Risiko einer unbeabsichtigten Verlagerung von Cry1Ab wäre bei sandigen stark vom Grundwasser - beeinflussten Böden sicher deutlich höher, als bei weniger nassen, tonhaltigen Böden. Tank *et al.* (2010) berichten von einer Freisetzung von Cry1Ab in Wassersysteme in einer Agrarlandschaft der USA. Als Haupteintragsweg identifizierten die Autoren allerdings die Verlagerung von Pflanzenmaterial und nicht die von freiem Cry1Ab durch Wurzeln oder aus Pflanzenresten. Die Daten der eigenen Untersuchungen demonstrieren eine relativ hohe Immobilität der Cry1Ab Proteine in den Böden und bestätigen damit die Annahme von Tank *et al.* (2010).

3.4.5 Toxikologische Bewertung

Die höchsten Cry1Ab-Konzentrationen, im Mittel waren dies $0,26 \text{ ng g}^{-1}$ im gesamten Anbaujahr, wurden bei den eigenen Untersuchungen während der Wachstumsphase des BT-Maises im Rhizosphärenboden gemessen. Diese Konzentration liegt um den Faktor 6.000 niedriger als der niedrigste in der Literatur angegebene LC_{50} -Wert für *Ostrinia nubilalis* im Boden ($1,55 - 24 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$, abhängig vom Gesamtgehalt des Cry1Ab-haltigen Bodens in der Nahrung (Saxena *et al.*, 1999; Marchetti *et al.*, 2007; McIntosh *et al.*, 1990)). Somit kann eine direkte Beeinflussung der Schädlinge oder gar von normalerweise deutlich weniger empfindlichen Nicht-Ziel-Organismen durch eine insektizide Wirkung des Cry1Ab im Boden wie sie bei Tapp & Stotzky (1998), Vettori *et al.* (2003), Zwahlen *et al.* (2003) und Saxena *et al.* (1999) diskutiert wurde, ausgeschlossen werden.

3.4.6 Zusammenhang zwischen Cry1Ab-Gehalten im Boden und physiko-chemischen sowie biologischen Bodenparametern

Ein wichtiges Ziel der Freilanduntersuchungen war es, den Zusammenhang zwischen den nachweisbaren Cry1Ab-Proteingehalten im Boden (wurzelfrei und Rhizosphäre) mit den physikochemischen sowie biologischen Bodeneigenschaften zu analysieren. Letztendlich können Erkenntnisse über derartige Zusammenhänge dazu beitragen, das Umweltverhalten von Cry1Ab aus BT-Mais bei dessen landwirtschaftlicher Nutzung vorauszusagen, idealerweise sogar hierzu Modelle aufzustellen. Als relevante Größen für die Bodeneigenschaften wurden die physikochemischen Parameter pH-Wert, Kationenaustauschkapazität, maximale Wasserhaltekapazität, Kohlenstoff- und Stickstoffgehalt, sowie die Korngrößenanteile (Ton, Sand, und Schluff) und der biologische Parameter Biomassekohlenstoffgehalt betrachtet. Die Messwerte der Bodeneigenschaften lagen im Bereich der für landwirtschaftliche Böden Deutschlands erwartet werden kann und sind

daher repräsentativ (Scheffer/Schachtschabel, 1998). Außerdem lagen sie, soweit bekannt, auch in dem Bereich von Böden die im Zusammenhang mit MON810 bereits untersucht wurden, wodurch ein Vergleich mit den eigenen Daten möglich wurde (Dubelman *et al.*, 2005; Hopkins & Gregorich, 2003). Es ist zu beachten, dass die ausgewählten Parameter nicht immer unabhängige Variablen darstellen: Die Kationenaustauschkapazität, die maximale Wasserhaltekapazität, der Kohlenstoff- und Stickstoffgehalt sowie die Korngrößenanteile beeinflussen sich gegenseitig, sind also voneinander abhängig (Scheffer/Schachtschabel, 1998). Die Messergebnisse dieser Arbeit zeigten deutlich die erwarteten Zusammenhänge. An sandigen Standorten wurden die niedrigsten Werte für Kationenaustauschkapazität, maximale Wasserhaltekapazität sowie Kohlenstoff- und Stickstoffgehalt gemessen, an Tonstandorten die höchsten.

Eine Reihe signifikanter Korrelationen zwischen dem Cry1Ab-Gehalt und allen untersuchten Bodenparametern konnten ermittelt werden. Signifikante Korrelationen die im Rhizosphärenboden und im wurzelfreien Boden gleichermaßen auftraten betrafen die Kationenaustauschkapazität, den Kohlenstoff- und Stickstoffgehalt des Bodens sowie die Korngrößenanteile Ton, Schluff und Sand. Die im wurzelfreien Boden etwas geringeren Signifikanzwerte (p-Werte) lassen sich auf die schlechtere Qualität der Messwerte zurückführen, da die Messungenauigkeit durch die geringen Cry1Ab-Konzentrationen erhöht war. Zum Boden-pH-Wert zeigte sich nur im wurzelfreien Boden eine signifikante Korrelation und zur Wasserhaltekapazität sowie zum Biomassekohlenstoffgehalt zeigten sich nur im Rhizosphärenboden signifikante Korrelationen. Die höchsten Korrelationen ergaben sich sowohl für Rhizosphäre- als auch für wurzelfreien Boden zu den Korngrößenfraktionen Ton und Sand. Dabei korrelierte der Cry1Ab-Gehalt negativ mit dem Tonanteil und positiv mit dem Sandanteil in den Böden. Grund dafür ist vermutlich eine mit steigendem Tongehalt stärker werdende Adsorption des Cry1Ab, die die auf Extraktion beruhende Quantifizierung mit ELISA beeinträchtigt und somit den tatsächlichen Cry1Ab-Gehalt im Boden verfälscht. Die starke Bindung an Ton wurde bereits in Laborstudien zur Adsorption von Cry1-Proteinen an Montmorillonite und Kaolinit (Tapp *et al.*, 1994) und von reinem Cry1Ab an Tonfraktionen aus landwirtschaftlich genutzten Böden (Pagel-Wieder *et al.*, 2007) gezeigt. In allen Fällen konnten nur maximal 10 % der sorbierten Cry1(Ab)-Proteine durch Extraktionen wieder desorbiert werden. Untersuchungen zur Wiederfindung von dem Boden zugesetztem reinen Cry1Ab anhand von Extraktion mit wässrigen Lösungen zeigten höhere Wiederfindungsraten, je geringer der Tongehalt der Böden war (Palm *et al.*, 1994; Marchetti *et al.*, 2007; Gruber *et al.*, 2011). Mit Bioassays wurden außerdem eine unveränderte Toxizität sowie eine Überdauerung bis zu 234 Tagen von im Boden gebundenem Cry1Ab festgestellt (Crecchio & Stotzky, 1998; Tapp &

Stotzky, 1995; Venkateswerlu & Stotzky, 1992). Welche Faktoren zu der starken Korrelation zwischen den nachweisbaren Cry1Ab-Gehalten und dem Ton- bzw. Sandanteil der Böden beitragen, wurde in Kapitel 3 dieser Arbeit bei der Verfolgung des Abbaus von ^{14}C -Cry1Ab im Boden mit ^{14}C -Massenbilanzen genauer untersucht.

Die Korrelation der Cry1Ab-Gehalte zum Biomassekohlenstoffgehalt verdeutlicht die Bedeutung der mikrobiellen Abundanz für den Abbau von Cry1Ab. Da sich kein signifikanter Zusammenhang der Biomassekohlenstoffgehalte mit den Ton- bzw. Sandgehalten zwischen den Standorten zeigte, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei der Abnahme der Cry1Ab Werte nicht ausschließlich um einen Adsorptionseffekt handelte, sondern um einen schnelleren Abbau des Cry1Ab an Standorten mit hohen Biomassekohlenstoffgehalten.

In anderen Untersuchungen wurde gezeigt, dass der Boden-pH-Wert den mikrobiellen Abbau des Cry1Ab im Boden beeinflussen kann. Bai *et al.* (2007) und Wang *et al.* (2006) berichteten über einen langsameren Abbau in saueren Böden (pH 4 - 5) im Vergleich zu neutralen (pH 6,5 - 7,5) bis basischen (< pH 7,5) Bedingungen. Wenn diese Beobachtungen auch für die Standorte der vorliegenden Arbeit gelten, müssten höhere Cry1Ab-Gehalte detektiert worden sein, je niedriger der Boden-pH-Wert war. Tatsächlich zeigte sich dieser Zusammenhang auch hier, allerdings nur im wurzelfreien Boden.

Der Boden-pH-Wert beeinflusst gleichzeitig die Adsorption des Cry1Ab an Tonminerale und Huminstoffe im Boden. Adsorptionsstudien zeigten, dass die Adsorption von Cry1Ab an Tonminerale mit steigenden pH-Werten von pH 4,5 bis pH 10 abnimmt (Venkateswerlu & Stotzky, 1992; Tapp & Stotzky, 1998; Pagel-Wieder *et al.*, 2007). Zudem ist die Adsorption des Proteins bei höheren pH-Werten deutlich schwächer, leichter reversibel und abhängig von der Konzentration in der flüssigen Phase (Madliger *et al.*, 2010 und 2011). Im neutralen bis basischen Bereich ist das Cry1Ab im Boden somit leichter für den mikrobiellen Abbau zugänglich, was sich in den eigenen Daten an den bei hohen pH-Werten niedrigeren Cry1Ab-Gehalten widerspiegelte.

Wang *et al.* (2008) fanden in einer Studie zur Adsorption von Cry1Ab beim Vergleich von fünf landwirtschaftlich genutzten Böden Hinweise für einen positiven Zusammenhang zwischen der Menge des adsorbierten Cry1Ab und dem Gehalt an organischer Substanz im Boden. Dieser Zusammenhang entspricht in der vorliegenden Arbeit der Korrelation zwischen Cry1Ab-Gehalten und Gesamtkohlenstoffgehalt und zeigte sich tatsächlich im wurzelfreien Boden sowie im Rhizosphärenboden. Im Gegensatz dazu berichteten Pagel-Wieder *et al.* (2004) von einer gegenteiligen Korrelation. Bei der Untersuchung der Ad-

sorption des Cry1Ab an die Tonfraktion landwirtschaftlich genutzter Böden wurde eine sinkende Adsorptionsaffinität mit steigendem Gehalt an organischer Substanz festgestellt, was bedeuten würde, dass höhere Cry1Ab Konzentrationen nachweisbar wären. Anhand der eigenen Daten kann aufgrund der Synchronität des Ton- und Gesamtkohlenstoffgehaltes keine Aussage darüber getroffen werden, ob die ermittelte Korrelation zwischen Gesamtkohlenstoffgehalt und Cry1Ab-Gehalt echt ist oder sich aufgrund des starken Zusammenhangs zwischen Cry1Ab-Gehalt und Tonanteil ergibt, so dass der von Pagel-Wieder *et al.* (2004) beschriebene Effekt überdeckt wäre.

3.4.7 Fazit

Die Cry1Ab-Gehalte in Boden und Pflanzen waren unabhängig von der Maisnutzung und der Maissorte, zeigten jedoch deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen landwirtschaftlichen Standorten. Die Untersuchungen zeigten, dass die Cry1Ab-Proteine in vergleichbaren Mengen über die Wurzeln während des Wachstums und, insbesondere nach der Ernte durch absterbende Maispflanzenreste, in den Boden gelangten. Die im Pflanzenmaterial eingeschlossenen Cry1Ab Proteine zersetzten sich vermutlich zum Großteil bevor sie die Bodenmatrix erreichten, wobei sehr niedrige Mengen, die etwa 0,06 % der Ausgangsmenge (bezogen auf Trockengewicht Pflanzenmaterial) entsprachen, aber auch über einen Zeitraum von bis zu 15 Monaten nach der Ernte auffindbar waren. Aus den Analysen der extrahierbaren Cry1Ab-Proteine ergaben sich keine Hinweise auf eine Akkumulation des Cry1Ab in Böden mit mehrjährigem MON810-BT-Mais Anbau. Es wurde eine geringfügige vertikale Verbreitung von Cry1Ab an Standorten mit grobkörnigeren Böden festgestellt. Das könnte z.B. bei Grundwassernähe, zu einer Abgabe von Spuren von Cry1Ab in das Grundwasser führen. Die große Übereinstimmung der im Freiland unter BT-Maisanbau beobachteten Cry1Ab-Gehalte an den eigenen Standorten sowie Standorten anderer Untersuchungen zeigte, dass die vorliegenden Ergebnisse repräsentativ sind und auch an weiteren Standorten zu erwarten wären. Im Boden wurde die messbare Cry1Ab-Konzentration ganz wesentlich durch die physikochemischen Eigenschaften bestimmt, wobei der Tonanteil eine besonders wichtige Rolle spielte. Allerdings zeigten die niedrigen Abbauraten im Winter auch, dass die biologische Aktivität für die Abnahme von Cry1Ab in Böden sehr wichtig ist. In wie weit die Abnahme von Cry1Ab durch Sorption oder biologischen Abbau beeinflusst wurde, wurde ergänzend in Laboruntersuchungen mit ¹⁴C-Cry1Ab in Böden im Kapitel 3 untersucht.

4 Herstellung von ^{14}C -Cry1Ab*

4.1 Einleitung

Trotz der bereits seit mehr als 20 Jahre andauernden Sicherheitsforschung zu Cry1Ab aus gentechnisch veränderten Pflanzen konnte das Verhalten dieses Proteins im Boden bisher nicht eindeutig geklärt werden. Unterschiedliche Studien haben bereits unter verschiedenen Laborbedingungen, in Mikrokosmen oder auch im Feldanbau, das Verhalten von Cry1Ab im Boden und in der Umwelt analysiert und die Ergebnisse aus diesen Studien erscheinen zum Teil widersprüchlich (vgl. Kapitel 3, Abschnitt 1). Neben den unterschiedlichen Versuchsbedingungen, z.B. Konzentrationen des eingesetzten Cry1Ab, könnte eine wichtige Ursache für uneinheitliche Ergebnisse in dem Fehlen von spezifischen und empfindlichen Analysemethoden zur Erfassung von Cry-Proteinen aus Umweltmedien bestehen (Accinelli *et al.*, 2008). Um dieses Problem zu lösen, wurde in der vorliegenden Arbeit das Cry1Ab Protein radioaktiv, mit ^{14}C markiert. Die ^{14}C -Markierung chemischer Verbindungen ist eine verbreitete Methode zur Untersuchung von Abbauprozessen in Böden (Butenschoen *et al.*, 2009; Cheshire *et al.*, 1990; Ishii *et al.*, 2010). Durch die Erfassung des bei der Mineralisation von ^{14}C -Cry1Ab freiwerdenden ^{14}C sowie die Aufstellung von Massenbilanzen über den Verbleib des ^{14}C im Boden ermöglicht diese Tracertechnologie den eindeutigen Nachweis des Cry1Ab und seiner Metabolite sowie eine nähere Charakterisierung von möglichen Adsorptionsprozessen an die Bodenmatrix (siehe hierzu Kapitel 3).

Die Herstellung von ^{14}C -Cry1Ab sollte in dieser Arbeit durch einen rekombinanten Cry1Ab exprimierenden Stamm von *Escherichia coli* durchgeführt werden. Dieser Stamm mit der Bezeichnung HB101 pMP wurde von der Arbeitsgruppe von Dr. Johannes Jehle (DLR, Neustadt an der Weinstraße) zur Verfügung gestellt. Zunächst musste das für die Synthese von nicht-radioaktiv markiertem Cry1Ab existierende Protokoll (Nguyen & Jehle, 2004) für die Herstellung von ^{14}C -Cry1Ab im Hinblick auf eine effiziente ^{14}C -Markierung des Cry1Ab durch die weitgehende Reduktion der Kohlenstoffquellen im Nährmedium auf die Anteile, die als ^{14}C zugegeben werden können, angepasst werden. Im zweiten Schritt erfolgte die ^{14}C -Markierung: Hierbei sollte ein Optimum zwischen einer möglichst hohen spezifischen ^{14}C -Markierung des Cry1Ab bei gleichzeitig möglichst geringer Wachstums-

* Die Ergebnisse dieses Kapitels wurden publiziert: Valldor *et al.*, 2012

beeinträchtigung durch die radioaktive Betastrahlung gefunden werden. Letztendlich gelang es, insgesamt sechs Produktionsansätze mit unterschiedlichen spezifischen ^{14}C -Markierungen (8.000 - 36.000 dpm mg^{-1} Cry1Ab) herzustellen, die dann für weitere Untersuchungen zum Abbau von Cry1Ab in Böden eingesetzt werden konnten.

4.2 Material und Methoden

4.2.1 Herstellung des ^{14}C -Cry1Ab mit Hilfe eines rekombinanten *Escherichia coli* Stammes

Die Synthese des ^{14}C -Cry1Ab durch den *E. coli* Stamm HB101 pMP erfolgte auf Basis des Protokolls von Nguyen & Jehle (2004) mit dem Cry1Ab aus *E. coli*-Batch-Kulturansätzen von bis zu 12 Litern gewonnen wurde. Mit dieser Methode können bis zu 0,04 g reines Cry1Ab-Toxin pro Liter Kultur gewonnen werden. Zudem eignet sie sich auch für Kulturansätze mit deutlich geringerem Volumen. Zur experimentellen Synthese von ^{14}C -Cry1Ab in dieser Arbeit wurden Kulturansätze von 200 ml genutzt.

4.2.1.1 Beschreibung des Produktionsstammes

Das ^{14}C -Cry1Ab wurde mit einem rekombinanten *E. coli*-Stamm HB101 synthetisiert, der das Plasmid pMP enthält. *E. coli* HB101 pMP ist ein *E. coli* K-12 Derivat, das für gentechnische Arbeiten weite Anwendung findet und kommerziell erhältlich ist, z.B. bei Promega (Promega GmbH, Mannheim). Das Plasmid pMP kodiert ein Protein mit der Aminosäuresequenz von Cry1Ab aus *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki* HD1 (Masson *et al.*, 1990). Der rekombinante Produktionsstamm exprimiert bei Kultivierung im Produktionsmedium (Zusammensetzung siehe unten) in Gegenwart des Antibiotikums Ampicillin Proteineinschlusskörper (sog. *Inclusionbodies*), die das Cry1Ab in einer Vorstufe, als Protoxin, enthalten. Das Protoxin ist noch nicht toxisch und mit 130 kDa etwa doppelt so groß wie das 60 kDa große, toxische Cry1Ab. Erst durch die Proteolyse mit Hilfe des Verdauungsenzyms Trypsin wird das Protoxin auf das trypsinresistente Kernstück Cry1Ab reduziert. (vgl. Kapitel 2, Abschnitt 4.2.1.7).

4.2.1.2 Kultivierung des Produktionsstammes

Alle Lösungen, Puffer und Nährmedien wurden autoklaviert (121 °C, 100 kPa, 20 min) oder steril filtriert (0,22 μm Millipore Filter, Merck Chemicals GmbH, Schwalbach).

4.2.1.2.1 Vorkultur

Aus Glycerin-Stammkulturen von *E. coli* HB101 pMP wurden die tiefgefrorenen Zellen direkt auf einen Nährboden (TB-Amp-Medium mit 1,5 % (w/v) Agar) geimpft und für 24 h bei 37°C bebrütet. Vom bewachsenen Nährboden aus wurden dann Kolonien abgenommen und in die sterilen Vorkulturmedien geimpft (jeweils 25 ml TB-Amp-Medium, Zusammensetzung siehe Tabelle 5 und Tabelle 6). Die Medien wurden in 100 ml Erlenmeyerkolben über Nacht bei 37°C schüttelnd (220 rpm; Infors AG CH-4103 Bottmingen-Inkubator) inkubiert.

Tabelle 5: Zusammensetzung des Vorkulturmediums

TB-Amp-Medium (<i>Terrific Broth</i> -Ampicillin-Medium, Sambrook & Russell, 2001):	<i>Bacto-trypton</i>	12 g
	<i>Bacto-yeast-extract</i>	24 g
	Glycerin	4 ml
	Glukose	2 % (w/v)
	10 x TB-Salz	100 ml
	Ampicillin (steril filtriert)	100 $\mu\text{g ml}^{-1}$
	ddH ₂ O	900 ml

Tabelle 6: Zusammensetzung des 10 x TB-Salzes für das Vorkulturmedium

10 x TB-Salz-Lösung:	KH ₂ PO ₄	11,55 g
	K ₂ HPO ₄	62,70 g
	ddH ₂ O	500 ml

4.2.1.2.2 Auswahl des Hauptkulturmediums

Die Zusammensetzungen der getesteten Hauptkulturmedien sind in Tabelle 7 bis Tabelle 11 dargestellt. In allen Ansätzen erfolgten die Kultivierungen jeweils in 200 ml Medium, dass in 500 ml Erlenmeyerkolben auf 37°C vorgewärmt und dann mit 200 μl Vorkultur angeimpft wurde. Die Hauptkulturen wurden bei 37°C für 48 h auf dem Schüttler (s. o.) bei 200 rpm inkubiert. Um den selektiven Druck zur Replikation des Plasmids mit dem Cry1Ab Gen aufrecht zu erhalten, wurde alle 24 h unter sterilen Bedingungen 400 μl steril-filtrierte Ampicillin-Lösung (aus 50 mg l⁻¹ Ampicillin-Stammlösung) in das Medium gegeben und so die Endkonzentration von mindestens 100 $\mu\text{g l}^{-1}$ im Medium sichergestellt. Regelmäßig während der Kultivierung wurden unter sterilen Bedingungen Proben entnommen um die *E. coli*-Zellen unter dem Mikroskop (Ph3, 1000x, oil; Olympus BH-210(100-fach)) auf ihre Fähigkeit Proteineinschlusskörper zu bilden, zu überprüfen. Um die *E. coli*-Zellen zu ernten, wurden die Kulturmedien für 20 min bei 8200 x g und 4°C zentrifugiert (Zentrifuge Sigma 6K10, Rotor 12500-H, Zentrifugenbecher NALGENE, 500 ml). Die Zellpellets wurden gewogen (ca. 2 bis 3 g FG bei 200 ml Medium, vgl. Tabelle 13) und bei -20°C bis zur weiteren Aufarbeitung gelagert.

Tabelle 7: Zusammensetzung der getesteten Hauptkulturmedien zur ¹⁴C-Cry1Ab-Produktion für Ansatz 1 bis Ansatz 4

	Ansatz 1 (Kapralkmedium, nach Kapralk <i>et al.</i> , 1991)	Ansatz 2	Ansatz 3	Ansatz 4 M9-Minimal- medium (DSMZ- Medium 382)
<i>Bacto-trypton</i>	10 g l ⁻¹	10 g l ⁻¹	5 g l ⁻¹	-
<i>Bacto-yeast-extract</i>	2 g l ⁻¹	2 g l ⁻¹	1 g l ⁻¹	-
Glycerin*	2 % (v/v)	2 % (v/v)	2 % (v/v)	2 % (v/v)
10 x Salz	10 % (v/v)	10 % (v/v)	10 % (v/v)	-
MgSO ₄	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM
CaCl ₂	0,1 mM	0,1 mM	0,1 mM	0,1 mM
Spurenelemente	0,5 % (v/v)	0,5 % (v/v)	0,5 % (v/v)	0,5 % (v/v)
Vitamine	0,05 % (v/v)	-	0,05 % (v/v)	-
Thiamin-HCl	200 mg l ⁻¹	200 mg l ⁻¹	200 mg l ⁻¹	200 mg l ⁻¹
Prolin	200 mg l ⁻¹	200 mg l ⁻¹	200 mg l ⁻¹	200 mg l ⁻¹
L-Leucin*	200 mg l ⁻¹	200 mg l ⁻¹	200 mg l ⁻¹	200 mg l ⁻¹
Ampicillin	100 µg l ⁻¹	100 µg l ⁻¹	100 µg l ⁻¹	100 µg l ⁻¹
10 x M9-Salz	-	-	-	10 %
ddH ₂ O	zu 1 l	zu 1 l	zu 1 l	zu 1 l

*zur Markierung wurde ¹⁴C-Glycerin und ¹⁴C-Leucin hinzugefügt (siehe Kapitel 2, Abschnitt 4.2.1.2.3)

Tabelle 8: Zusammensetzung des 10 x Salzes bei Ansatz 1 bis 3

10 x Salz:	Na ₂ HPO ₄ * 12H ₂ O	286 g
	KH ₂ PO ₄	26 g
	ddH ₂ O	zu 1 l
	(auf pH 7,4 einstellen)	

Tabelle 9: Zusammensetzung des 10 x M9 Salzes bei Ansatz 4

10 x M9 Salz:	Na ₂ HPO ₄ * 7 H ₂ O	60 g
	KH ₂ PO ₄	30 g
	NH ₄ Cl	10 g
	NaCl	5 g
	ddH ₂ O	zu 1 l

Tabelle 10: Zusammensetzung der Spurenelemente für Ansatz 1 bis 4

Spurenelemente:	Na ₂ -EDTA	250 mg l ⁻¹
	ZnSO ₄ * 7H ₂ O	2 mg l ⁻¹
	MnCl ₂ * 4H ₂ O	5 mg l ⁻¹
	FeSO ₄	10 mg l ⁻¹
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ * 4H ₂ O	0,2 mg l ⁻¹
	H ₃ BO ₃	1 mg l ⁻¹
	CuSO ₄ * 7H ₂ O	0,2 mg l ⁻¹
	CoCl ₂ * * 6H ₂ O	0,2 mg l ⁻¹
	ddH ₂ O	zu 100 ml

Tabelle 11: Zusammensetzung der Vitamine für Ansatz 1 und 3

Vitamine:	Thymidin	0,5 mg l ⁻¹
	p-Aminobenzoat	0,5 mg l ⁻¹
	Biotin (B ₇)	0,5 mg l ⁻¹
	Nikotinsäure (B ₃)	1 mg l ⁻¹
	Pantothensäure (B ₅)	0,5 mg l ⁻¹
	Pyridoxin (B ₆)	1 mg l ⁻¹
	Cyanocobalamin (B ₁₂)	0,5 mg l ⁻¹
	ddH ₂ O	zu 100 ml

4.2.1.2.3 Produktionsbedingungen von ^{14}C -Cry1Ab (Hauptkultur)

Als Medium für die Hauptkultur wurde Kapralek-Medium ohne Vitaminzugabe (siehe Kapitel 2, Abschnitt 4.2.1.2.2, Ansatz 2) mit einem Glyceringehalt von 1 % (v/v) ausgewählt. Für die ^{14}C -Markierung der Zellen wurden als alleinige ^{14}C -Kohlenstoff-Quellen ^{14}C -markiertes Glycerin ([U- ^{14}C]Glycerin, Amersham, GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg) sowie die essentielle Aminosäure ^{14}C -Leucin (L-[U- ^{14}C]Leucine, Amersham, GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg) genutzt. Die Konzentration des Glycerin im Medium betrug 130 mM, die des Leucin 23 mM. Die Produktion von ^{14}C -Cry1Ab erfolgte in insgesamt sechs Kulturansätzen mit zwei unterschiedlichen Mengen an zugesetzter Radioaktivität. Bei den Ansätzen 1 bis 4 wurde jeweils ein Milliliter ^{14}C -Glycerin mit einem Milliliter nicht markiertem Glycerin verdünnt, so dass zu jedem Ansatz eine Gesamtaktivität von 55 μCi (entspricht ca. 112.000.000 dpm oder 1900 kBq) zugegeben wurde.

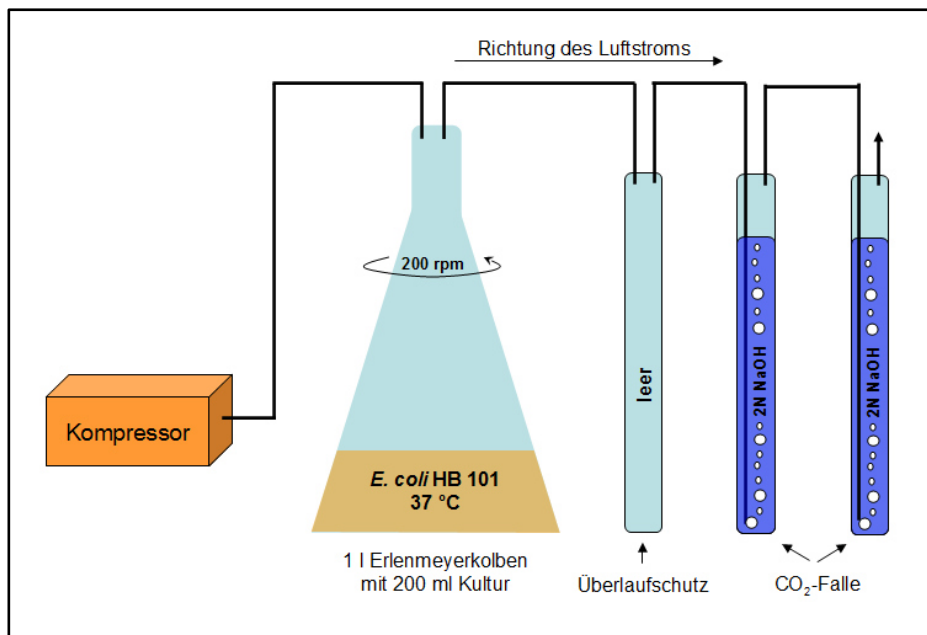


Abbildung 12: Versuchsanordnung zur Kultivierung von *E. coli* HB101 pMP in Gegenwart von ^{14}C -Glycerin und ^{14}C -Leucin für die Biosynthese von ^{14}C -Cry1Ab

Bei den Ansätzen 5 bis 6 wurde die Zugabeaktivität erhöht, indem jeweils 2 ml ^{14}C -Glycerin und 0,5 ml ^{14}C -Leucin zugegeben wurden, so dass sich insgesamt 125 μCi (289.112.000 dpm) im Produktionsmedium zu Inkubationsbeginn befanden. Für die spätere Bilanzierung der eingesetzten ^{14}C Mengen wurden die Kulturen mit Hilfe eines Kompressors (Rudolf Brand GmbH & Co Laborgeräte und Vakuumtechnik, RS4 vacUU-brand Drehscheiben-Vakuumpumpe) mit 6 - 7 ml s^{-1} kontinuierlich belüftet, so dass das bei der Atmung der Kulturen entstehende CO_2 in zwei hintereinander geschalteten, jeweils mit 2N NaOH gefüllten Reagenzgläsern (20 x 150 mm, Duran) aufgefangen werden konnte (siehe Abbildung 12). Die Kultivierung erfolgte wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben, jedoch betrug die Inkubationszeit für Ansätze 1 bis 5 jeweils 96 h und für den Ansatz 6 insgesamt 144 h. Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate des ^{14}C wurde nach der Ernte der Kulturen die ^{14}C -Aktivität des Überstandes gemessen und als „Rest-medium“ in die Massenbilanz aufgenommen.

4.2.1.3 Lysis der Zellen

Um die Cry1Ab-Einschlusskörper mit hoher Ausbeute zu isolieren wurde ein optimaler Zellaufschluss (Lysis) angestrebt. Die *E. coli*-Zellen wurden dazu folgenden Behandlungsschritten unterworfen: Suspendierung in Lysispuffer, Lysis der *E. coli*-Zellen mit Lysozym, Freisetzung der DNA mit Desoxycholsäure und Abbau der DNA mit DNase I. Die zugesetzten Mengen der einzelnen Substanzen waren von der Masse (Feuchtgewicht, FG) der geernteten *E. coli*-Zellen abhängig. Dadurch ergab sich für jeden Kultivierungsansatz eine individuelle Konzentration der Stoffe in der Zellsuspension. Die folgenden Mengenangaben für Lysozym, Desoxycholsäure sowie DNase I beziehen sich auf die Masse von 1 g *E. coli*-Zellen (FG).

Die eingefrorenen Zellpellets wurden in 3 ml g^{-1} Lysispuffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 5 mM EDTA; 100 mM NaCl) aufgetaut und mit Hilfe eines Vibrationsmixers (Vortex VF2, Janke & Kunkel IKA-Labortechnik) suspendiert. Anschließend wurde die Suspension in 100 ml Weithals-Erlenmeyerkolben überführt. Zur Suspension wurden jeweils 1.600 $\mu\text{g g}^{-1}$ Lysozym (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) gegeben und die Zelllösung für 30 min bei Raumtemperatur unter Schütteln (90 rpm, Infors AG CH-4103 Bottmingen) inkubiert. Anschließend wurde unter kontinuierlichem Rühren tropfenweise Desoxycholsäure zugegeben (4 mg g^{-1} Desoxycholsäure), um die DNA freizusetzen. Die Lösung wurde weitere 10 min auf dem Schüttler bei 90 rpm und 37°C inkubiert bis sie durch die freigesetzte DNA viskos wurde. Danach wurde DNase I (400 $\mu\text{l g}^{-1}$ DNase I aus 1 mg ml^{-1} DNase I Stammlösung) zugegeben und 30 min bei 37°C und 100 rpm geschüttelt bis die Viskosität abnahm, was auf den Abbau der DNA schließen ließ. Dann wurde das Zell-Lysat auf Eis

gekühlt, 30 s mit Ultraschall (Sonorex RK 255H, Bandelin GmbH, Berlin) behandelt und anschließend 10 min bei 5.000 x g und 4°C zentrifugiert (Zentrifuge Sigma 6K10). Der entstehende Überstand wurde mit einer Pipette (1.000 µl, Eppendorf) abgenommen und als radioaktiver Abfall gesammelt. Die Radioaktivität aller angefallenen Abfälle während des gesamten Aufreinigungsprozesses wurde für die ^{14}C -Massenbilanz nach der ^{14}C -Cry1Ab-Produktion im Szintillationszähler (LS 1801, Beckmann) gemessen und als „Produktionsreste“ in der Massenbilanz angegeben. Alle weiteren Arbeitsschritte zur Gewinnung des Cry1Ab Proteins wurden auf Eis bzw. bei 4°C gekühlt durchgeführt, um einen proteolytischen Abbau des Zielproduktes zu hemmen.

4.2.1.4 Reinigung der Cry1Ab-Einschlusskörper

Die wie oben beschrieben gereinigten Pellets wurden jeweils in 20 ml gekühltem Waschpuffer (20 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 M NaCl; 1 % (v/v) Triton X-100) mit einem Homogenisator (Ultra-Turrax, Janke & Kunkel IKA-Labortechnik) resuspendiert und anschließend für 8 min bei 9.000 x g zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Anschließend erfolgten drei weitere Reinigungsdurchgänge, wie oben beschrieben, jedoch wurde dabei Waschpuffer durch PBS-Puffer (137 mM NaCl, pH 7,4; 2,7 mM KCl; 10 mM Na_2HPO_4 ; 2 mM KH_2PO_4) ersetzt. Schließlich wurde der PBS-Puffer durch ddH₂O ersetzt und das Pellet solange gereinigt bis es weiß und fest erschien, was nach etwa 10 Reinigungsdurchgängen der Fall war. Das gereinigte Pellet wurde bei -20°C bis zur weiteren Aufarbeitung, die in der Regel innerhalb der nächsten 16 Stunden erfolgte, gelagert. Die Radioaktivität der Waschüberstände wurde bestimmt und in die Massenbilanz unter „Produktionsreste“ aufgenommen.

4.2.1.5 Überführung des Cry1Ab in die lösliche Phase (Solubilisierung)

Das gereinigte Pellet wurde in 50 mM CAPS Lösungspuffer (Cyclohexylaminopropan-sulfonsäure, pH 10,5, 0,25% (v/v) β -Mercaptoethanol) für 3 h bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Dabei wurde das Protoxin (130 kDa) aus den Einschlusskörpern gelöst. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 20 min bei 10.000 x g und 4°C. Der Überstand mit dem gelösten Protoxin wurde mit einer Pipette in ein Polypropylenröhrchen (*Falcontube*; 50 ml, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) überführt. Das Pellet wurde als radioaktiver Abfall (siehe „Produktionsreste“ in der Massenbilanz) gesammelt.

4.2.1.6 Reinigung des Cry1Ab-Protoxins durch Ultrafiltration

Die Protoxinlösung wurde zunächst über einen Filter mit einem Porendurchmesser von 0,45 µm filtriert (Nylon, Whatman GmbH, Dassel) und anschließend mit einem ViVaSpin 20 Filter (Ausschlussgrenze 50.000 dalton; 50.000 MWCO PES, Sartorius AG,

Göttingen) aufkonzentriert (5 min bei 4000 x g und 4°C; Eppendorf Centrifuge 5403). Dann wurde das Protoxinkonzentrat mit CAPS-Puffer (50 mM CAPS, pH 10.5) zur weiteren Verarbeitung auf 3 ml aufgefüllt. Der Proteingehalt dieser Lösung wurde mit einem Bicinchoninsäure-Proteinbestimmungskit (BCA Protein Assay Reagent Kit, Pierce-Fisher Scientific GmbH, Schwerte) ermittelt. Der Test beruht auf dem photometrischen Nachweis von Proteinen aufgrund der Komplexbildung der Bicinchoninsäure (BCA) mit Kupferionen, die zuvor durch die Proteine von Cu(II) zu Cu(I) reduziert worden sind. Da zu diesem Zeitpunkt auch noch andere Zellproteine in der Protoxinlösung enthalten waren, bezog sich der Proteingehalt nicht direkt auf den Gehalt an Cry1Ab-Protoxin, sondern auf die Gesamtproteinmenge.

4.2.1.7 Trypsinisierung des Protoxins

Die Protoxinlösung wurde mit der Peptidase Trypsin behandelt, um die noch enthaltenen Cry1Ab-fremden Proteine zu zersetzen und gleichzeitig das Cry1Ab in seine toxikologisch aktive Form zu überführen. Durch das Trypsin wird das Cry1Ab-Protoxin von 130 kDa bis auf den trypsinresistenten Kern von 60 kDa, das aktive Cry1Ab-Toxin, verdaut. Dafür wurde das Protoxinkonzentrat unter kontinuierlichem Rühren tropfenweise mit Trypsinlösung (Trypsinmenge: 1 mg Trypsin (13500 u mg^{-1} , Sigma Aldrich, Steinheim) pro ml Protoxinlösung, gelöst in 20 mmol Tris HCl, pH 8.0) versetzt. Da das Trypsin am effektivsten im pH-Bereich von 7 - 8 arbeitet, das Cry1Ab-Toxin jedoch nur im basischen Bereich ($> \text{pH } 9,0$) in Lösung bleibt, wurde der pH-Wert mit 1 M HCl auf pH 9,5 eingestellt, um ein Ausfällen des Cry1Ab-Toxins zu vermeiden. (Durch den in der Protoxinlösung enthaltenen CAPS-Puffer ergibt sich nach Zugabe der Trypsinlösung ein pH-Wert von etwa pH 10.) Die Lösung wurde über Nacht in einem sterilen Messbecher (Glas, 10 ml) bei Raumtemperatur gerührt (Rührer RCT basic, IKA-Labortechnik, Staufen).

4.2.1.8 Reinigung des Toxins durch Ultrafiltration

Um das Toxin von den Abbauprodukten (Peptide, freie Aminosäuren) zu trennen, wurde die Toxinlösung nach der Trypsinisierung durch Ultrafiltration gereinigt. Die Ultrafiltration erfolgte wie bei der Reinigung des Protoxins, jedoch mit einem Filter mit einer 20 kDa niedrigeren Ausschlussgrenze (ViVaSpin 20, Ausschlussgrenze 30.000 Dalton, 30000 MWCO PES, Sartorius AG, Göttingen). Das Toxinkonzentrat wurde mit CAPS-Puffer anschließend auf 2 ml aufgefüllt und der Proteingehalt mit dem *BCA Protein Assay Kit* nach Anweisung des Herstellers ermittelt. Die molekulare Größe und Reinheit des Toxins wurde elektrophoretisch mit einer SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese) bewertet (siehe Kapitel 2, Abschnitt 4.2.3).

4.2.1.9 Lagerung des ^{14}C -Cry1Ab-Proteins

Das hergestellte ^{14}C -Cry1Ab-Protein wurde aliquotiert und in CAPS-Puffer (pH 10,5) bei -70°C in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen gelagert.

4.2.2 Messung der Aktivität des ^{14}C -Cry1Ab

Von jeder mit dem hier beschriebenen Verfahren hergestellten ^{14}C -Cry1Ab-Lösungen (Chargen) wurden jeweils 100 μl zur Messung der radioaktiven β -Strahlung des ^{14}C abgenommen und mit 16 ml Szintillationslösung (Rotiszint eco plus, Roth, Karlsruhe) versetzt. Die Szintillationslösung bewirkt, dass die kinetische Energie der Kernemissionen der β -Strahler in emittierte Photonen umgewandelt wird (Stolz, 2005; Vogel, 1999). Die Messung der Lichtemissionen aus der Szintillationslösung erfolgte anschließend in 20 ml Szintillationsgefäßen (Zinsser Analytic GmbH, Frankfurt) in einem Szintillationsmessgerät (LS 1801, Beckman Coulter, Krefeld). Die Proben wurden für jeweils 3 h gemessen. Die Ergebnisse wurden vom Szintillationsmessgerät in cpm (*counts per minute*) und dpm (*disintegrations per minute*; Berücksichtigung des Quench-Effekts) ausgegeben.

4.2.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Bewertung des Molekulargewichtes und der Reinheit des produzierten Cry1Ab wurden die Protoxin- und Toxinlösungen mit Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) untersucht. Die SDS-PAGE wurde nach der Methode von Laemmli (1970) hergestellt und durchgeführt.

4.2.3.1 Herstellung der SDS-Gele

Für die SDS-PAGE-Analysen wurden Gele für Analysen mit der Mini-Protean® 3 Cell (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) entsprechend den Herstellerangaben hergestellt. Die Zusammensetzung der Gele ist in Tabelle 12 angegeben. Für die Untersuchungen wurden ausschließlich Gele im Format 83 x 73 x 0,75 mm verwendet. Die Gele setzten sich aus zwei übereinanderliegenden Schichten, dem Sammelgel und dem Trenngel zusammen. Die Proben wurden in das Sammelgel geladen und wanderten von dort in das Trenngel. Dadurch wurde eine Trennung der Proteinbanden erreicht. Im ersten Schritt wurde das Trenngel gegossen und mit ddH_2O überschichtet (Polymerisationszeit 50 min). Danach wurde auf das Trenngel das Sammelgel gegossen und für ebenfalls 50 min bei Raumtemperatur (ca. 20°C) polymerisiert. Die fertigen Gele wurden in Frischhaltefolie verpackt, bei 4°C gelagert und innerhalb einer Woche verbraucht.

Tabelle 12: Zusammensetzung von Trenngel und Sammelgel für die SDS-PAGE-Analyse

Komponenten	Trenngel (8 % Acrylamid)	Sammelgel (5 % Acrylamid)
ddH ₂ O	4,6 ml	1,4 ml
30 % (w/v) Acrylamid-Mix (Rotiphorese gel 30, Roth)	2,7 ml	0,33 ml
1.5 M Tris (pH 8.8)	2,5 ml	-
1.5 M Tris (pH 6.8)	-	0,25 ml
10 % (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)	0,1 ml	0,02 ml
10 % (w/v) Ammoniumpersulfat (APS)	0,1 ml	0,02 ml
TEMED (N,N,N',N', Tetramethylethylen-amin)	0,006 ml	0,002 ml
Gesamtvolumen	10 ml	2 ml

4.2.3.2 Elektrophorese

Die Gele wurden in die Elektrophoresekammer (Mini-Protean® 3 Cell, Bio-Rad Laboratories GmbH, München) gehängt und die Kammer entsprechend den Herstellerangaben mit Elektrophoresepuffer (25 mM Tris, 250 mM Glycine, 0,1 % (w/v) SDS, auf ddH₂O) aufgefüllt. Die Proteinlösungen wurden mit dem Ladepuffer (50 mM Tris-HCl (pH 6,8), 2 % (w/v) SDS, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau, 10% (v/v) Glycerin, 1,25 % (v/v) β -Mercaptoethanol, auf ddH₂O) bei kurzem Zentrifugieren (Eppendorf, 5417C) gemischt und danach für 5 min bei 95°C im Thermomixer (Eppendorf, 5436) denaturiert. Danach wurden die so vorbereiteten Proben auf das Gel geladen. Für die Kalibrierung der Proteingrößen wurde ein Proteinstandard mit Molekulargewichten von 10 bis 220 kDa (*BenchMark™ Protein Ladder*, Invitrogen GmbH, Darmstadt) verwendet. Die Elektrophorese wurde bei 74 V gestartet, bis die Farbfront in das Trenngel gelaufen war (nach ca. 15 min), danach wurde die Spannung auf 150 V erhöht. Die Elektrophorese dauerte 45 bis 60 Minuten und wurde beendet, wenn die Farbfront das untere Ende des Gels erreicht hatte.

4.2.3.3 Färbung der Gele

Die Gele wurden mit *Coomassie Brilliant Blue* gefärbt. Dafür wurde das Gel für 60 min in der Färbelösung (25 % (v/v) Isopropanol, 10 % (v/v) Acetylsäure, 0,004 % (w/v) *Coomassie Brilliant Blue* R-250 (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) auf dem Schüttler (60 rpm, Infors AG CH-4103, Bottmingen) inkubiert und anschließend über Nacht in 0,5 % (v/v) Acetylsäure, 0,75 % (v/v) Methanol entfärbt bis die Proteinbanden deutlich zum Vorschein traten. Danach wurden die gefärbten Gele auf einem Flachbrettscanner für die

Dokumentation digitalisiert. Zur Lagerung wurden die Gele in Kunststoff eingeschweißt und bei 4°C aufbewahrt.

4.2.4 Abschätzung der Reinheit des hergestellten ^{14}C -Cry1Ab

Anhand der SDS-Gele wurde die Reinheit des ^{14}C -Cry1Ab-Toxins über graphische Auswertung der Proteinbanden abgeschätzt. Dafür wurde mit der frei verfügbaren Software *ImageTool* (Version 3.00, *The University of Texas Health Science Center, San Antonio*) die Pixelintensität der Banden über dem Molekulargewicht ausschnittsweise im Zentrum der jeweiligen Gelspur dargestellt und integriert (siehe Abbildung 13).

Die Reinheit des Cry1Ab-Toxins wurde danach mit folgender Berechnung abgeschätzt:

$$\text{Reinheit (Gew. - \%)} = \frac{\left(\int I_{\text{Cry 1 Ab}} \right) \cdot 100}{\left(\int I_{\text{Cry 1 Ab}} \right) + \left(\int I_{\text{Bruchstück}} \right)} \quad (\text{I-Intensität})$$

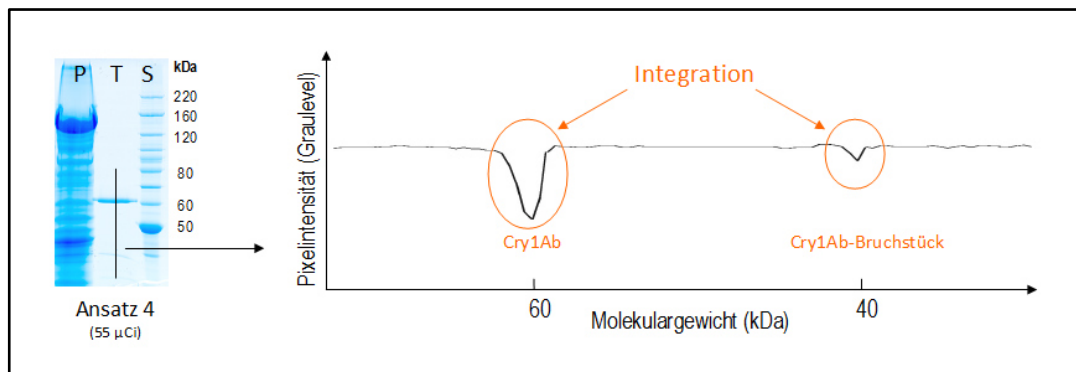


Abbildung 13: Schematische Übersicht zur Vorgehensweise bei der grafischen Ermittlung der Reinheit des hergestellten ^{14}C -Cry1Ab aus einer SDS-Gelgrafik (P-Cry1Ab-Protoxin, T-Cry1Ab-Toxin, S-Standard)

Da der Farbstoff *Coomassie Brilliant Blue* massenproportional an das Protein bindet (Przybylski *et al.*, 2008) können aus der Integration der Pixelintensitäten und dem Verhältnis zwischen Cry1Ab-Peak und Bruchstück-Peak direkt die prozentualen Anteile der Proteinmassen ermittelt werden.

4.3 Ergebnisse

Ziel dieses Untersuchungsteils (Kapitel 2) war es, ^{14}C -markiertes Cry1Ab herzustellen, um es in einem Laborversuch für Abbauuntersuchungen in Böden zu verwenden. Für eine möglichst hohe Ausbeute und spezifische Aktivität von ^{14}C musste die herkömmliche Cry1Ab-Produktionsmethode mit einem rekombinanten *E. coli* Stamm, die auf der Verwendung von normalem nicht radioaktiven Kohlenstoffatomen beruht und die von Nguyen & Jehle (2004) entwickelt worden war, modifiziert werden. In einem ersten Schritt wurden die ^{14}C -markierten Kohlenstoffquellen im Nährmedium der Zellen soweit wie möglich limitiert, um hohe Radioaktivitätsverluste beim Einbau in das Protein zu vermeiden. Im zweiten Schritt wurden verschiedene Radioaktivitätsmengen in die Biosynthesen eingesetzt, um die optimale spezifische Aktivität zu erreichen. Je höher die Markierung des Cry1Ab desto sensitivere Untersuchungen sind damit im Abbauversuch möglich.

4.3.1 Limitierung der Kohlenstoffquellen

4.3.1.1 Anpassung der Kultivierungsmethode zur Produktion von ^{14}C -Cry1Ab

Die Produktion von Cry1Ab nach dem Protokoll von Nguyen & Jehle (2004) erfolgt in TB-Medium, wobei die Bakterien unterschiedliche C-Quellen zum Wachstum nutzen können. Im Produktionsmedium für ^{14}C -Cry1Ab sollte die ^{14}C -Markierung über ^{14}C -Glycerin eingeführt werden. *E. coli* kann Glycerin als alleinige C-Quelle zum Wachstum verwerten (Amersham, GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg). Aufgrund der Auxotrophien des *E. coli* HB101 Stamms für verschiedene Wachstumsfaktoren konnte die Produktion von ^{14}C -Cry1Ab jedoch nicht in reinem Minimalmedium erfolgen. Die Wachstumsfaktoren sollten durch den dosierten Zusatz von Komplexnährstoffen zugegeben werden.

Um eine möglichst hohe Aufnahmerate des ^{14}C aus dem zugegebenen ^{14}C -Glycerin durch die *E. coli*-Zellen zu erzielen, wurde zunächst überprüft, ob und wie weit die ^{14}C -freien C-Quellen aus dem im Medium enthaltenen Komplexnährstoffen ohne gravierende Auswirkung auf die Cry1Ab-Ausbeute reduziert werden können. Dazu wurde das für die Kultivierung der *E. coli*-Zellen in der Hauptkultur genutzte TB-Medium durch das komplexnährstoffärmere Kapralekmedium (Kaprak et al., 1991) ersetzt. Insgesamt wurden in diesem Zusammenhang vier Ansätze getestet. Bei Ansatz 1 wurden keine Modifikationen in der Rezeptur des Kapralekmediums vorgenommen, bei Ansatz 2 wurde Kapralek-

medium ohne Vitaminzugabe genutzt und bei Ansatz 3 wurde der Gesamtgehalt an Komplexnährstoffen gegenüber dem herkömmlichen Kapralek-Medium halbiert. In einem vierten Ansatz wurde schließlich zusätzlich ein komplexnährstofffreies Medium getestet. Dazu wurde das Kapralekmedium gegen ein M9-Minimalmedium (DSMZ-Medium 382, DSMZ-GmbH, Braunschweig) ausgetauscht. Die genauen Zusammensetzungen der vier Kulturmedien sind in Tabelle 7 aufgeführt. Die Inkubationszeit bis zur Ernte betrug für alle Ansätze 48 h. Die jeweils mit den verschiedenen Medien erhaltenen Ausbeuten an Cry1Ab-Protoxin bzw. Cry1Ab-Toxinlösungen wurden im SDS-Gel verglichen (siehe Abbildung 14).

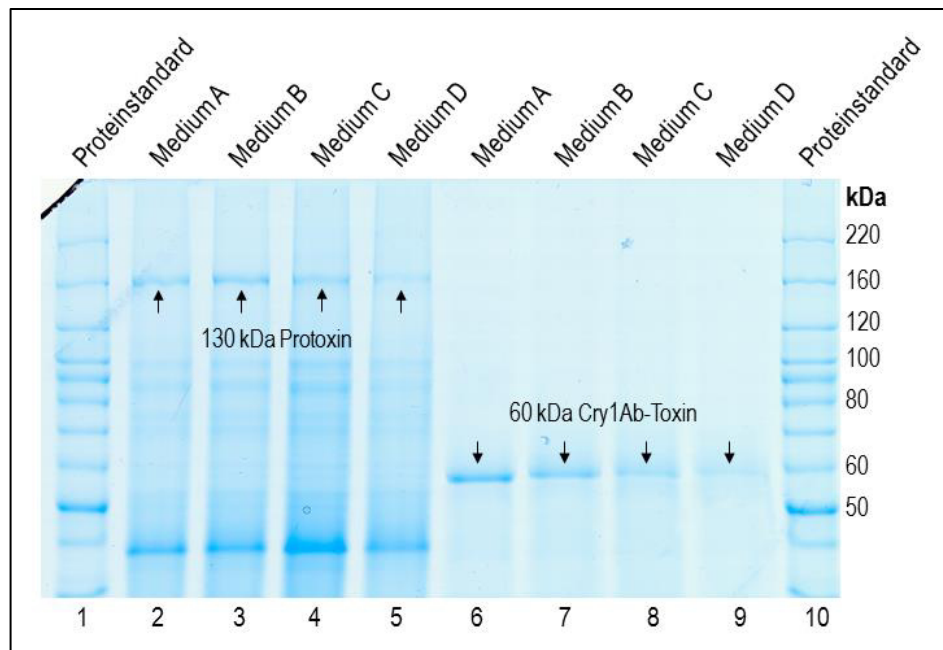


Abbildung 14: SDS-Gel mit Cry1Ab-Protoxinbanden (Reihe 2-5) und Cry1Ab-Toxinbanden (Reihe 6-9) der Cry1Ab-Produktion zum Vergleich der Reinheit und Ausbeute des Cry1Ab aus *E. coli*-Kulturansätzen (200 ml) mit vier verschiedenen Medien. (A-Kapralekmedium mit Vitaminzugabe, B-Kapralekmedium ohne Vitaminzugabe, C-reduziertes Kapralekmedium, D-Minimalmedium M9)

In allen Ansätzen waren deutliche Banden des Cry1Ab Protoxins bzw. des Toxins zu erkennen. Das Cry1Ab-Toxin wurde durch Trypsinisierung des Cry1Ab-Protoxins hergestellt (siehe Kapitel 2, Abschnitt 4.2.1.7). Die Intensität der Banden korrelierte mit dem Nährstoffgehalt des Mediums. Auch mikroskopisch ließen sich in den *E. coli*-Zellen Proteineinschlusskörper mit dem Cry1Ab Protoxin erkennen und ihre Anzahl korrelierte ebenfalls mit dem Nährstoffgehalt des Mediums (Daten nicht gezeigt). Bestätigt wurde die in der Abbildung 14 dargestellte Ausbeute auch durch die Quantifizierung der Cry1Ab-Protoxin und Toxinkonzentrationen in den einzelnen Ansätzen mit dem *BCA-Protein-Assay-Kit* (Tabelle 13). Beim Vergleich der Protoxinmengen muss hierbei berücksichtigt

werden, dass durch das *BCA-Protein-Assay* alle in der Protoxinlösung enthaltenen Proteine erfasst werden und somit die Verhältnisse der gemessenen Protoxinmengen zwischen den Medien A – D (Reihe 2-5, Abbildung 14) nur einen ungefähren Rückschluss auf den tatsächlichen Zusammenhang zulassen. Erst die Quantifizierung des aus dem Protoxin gewonnenen und von Cry1Ab-fremden Proteinen befreiten Cry1Ab-Toxins zeigt die tatsächlichen Cry1Ab-Ausbeuten in den Medien (Reihe 6-9, Abbildung 14). Die Reinheit des Cry1Ab-Toxins wurde anhand des SDS-Gels bestätigt.

Tabelle 13: Quantifizierte Cry1Ab-Protoxin- und Cry1Ab-Toxinmengen zum Vergleich der Cry1Ab-Ausbeute aus 200 ml *E. coli*-Kulturansätzen mit vier verschiedenen Medien (A - Kapralekmedium mit Vitaminzugabe, B - Kapralekmedium ohne Vitaminzugabe, C - reduziertes Kapralekmedium, D - Minimalmedium M9)

	Gesamtkohlenstoff- gehalt des Mediums [g l ⁻¹]	Protoxin (130 kDa) [mg]*	Toxin (60 kDa) [mg]*
Medium-A	6,4 (+ Vitamine)	13,6	3,0
Medium-B	6,4	11,4	3,2
Medium-C	5,2	10,6	2,2
Medium-D	4,0	7,4	1,4

*absolute Menge aus 200 ml Kulturansatz

In Medium A, mit dem höchsten Nährstoffgehalt, wurde mit 13,6 mg fast doppelt soviel Protoxin produziert wie im nährstoffärmsten Medium D mit 7,4 mg. Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich beim Vergleich der aus dem Protoxin trypsinisierten Toxinmengen. Mit Medium A wurde eine Ausbeute von 3,0 mg Toxin erzielt, in Medium D jedoch lediglich 1,4 mg.

Die Protoxinmenge lag bei Medium B und C entsprechend den Nährstoffgehalten zwischen den Medien mit den höchsten und niedrigsten Protoxingehalten. Im Gegensatz dazu wurde in Medium B mit 3,2 mg Toxin trotz geringerem Nährstoffgehalt die gleiche Toxinmenge erreicht wie in Medium A. Mit Medium C wurde mit 2,2 mg Toxin die doppelte Menge wie in Medium D und etwa 1 mg weniger als in Medium A gebildet.

Unter dem Mikroskop zeigte sich, dass die *E. coli*-Zellen aus Kapralek-Medium wesentlich kleiner waren als die Zellen aus dem TB-Medium der Vorkultur (vgl. auch Abbildung 16). Trotzdem waren bei Medium A und B in allen *E. coli*-Zellen ein- oder mehrere große Proteineinschlusskörper zu erkennen. In Abbildung 15 sind beispielhaft *E. coli*-Zellen mit Proteineinschlusskörpern aus der Vorkultur (TB-Medium) dargestellt. Auch in Medium C und D zeigten sich Proteineinschlusskörper, diese waren jedoch im Vergleich zu Medium

A und B wesentlich kleiner. Während in Medium C noch die meisten Zellen mehrere Proteineinschlusskörper aufwiesen, besaßen in Medium D mit dem geringsten Nährstoffgehalt die meisten Zellen nur noch ein bis zwei Proteineinschlusskörper.

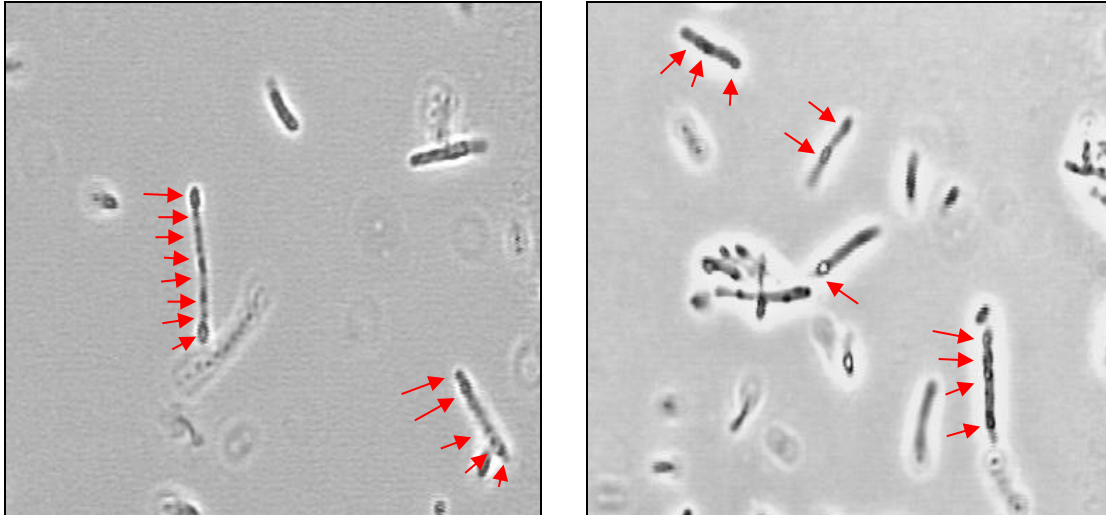


Abbildung 15: Lichtmikroskopische Aufnahme von *E. coli* Zellen mit Proteineinschlusskörpern; hier aus der Vorkultur nach 3-tägigem Wachstum (Proteinkristalle sind mit Pfeilen gekennzeichnet, Mikroskop Olympus, Ph3, 1000x, Öl, BH-210(100-fach)), sowie zusätzlicher graphischer Zoom)

Der Größenunterschied der *E. coli*-Zellen, der sich durch das Wachstum in den verschiedenen Medien ergab, ist in Abbildung 16 dargestellt. Um den Größenunterschied sichtbar zu machen, sind die *E. coli*-Zellen aus der Hauptkultur (Kapralekmedium) und Vorkultur (TB-Medium) bei gleicher Vergrößerung abgebildet.

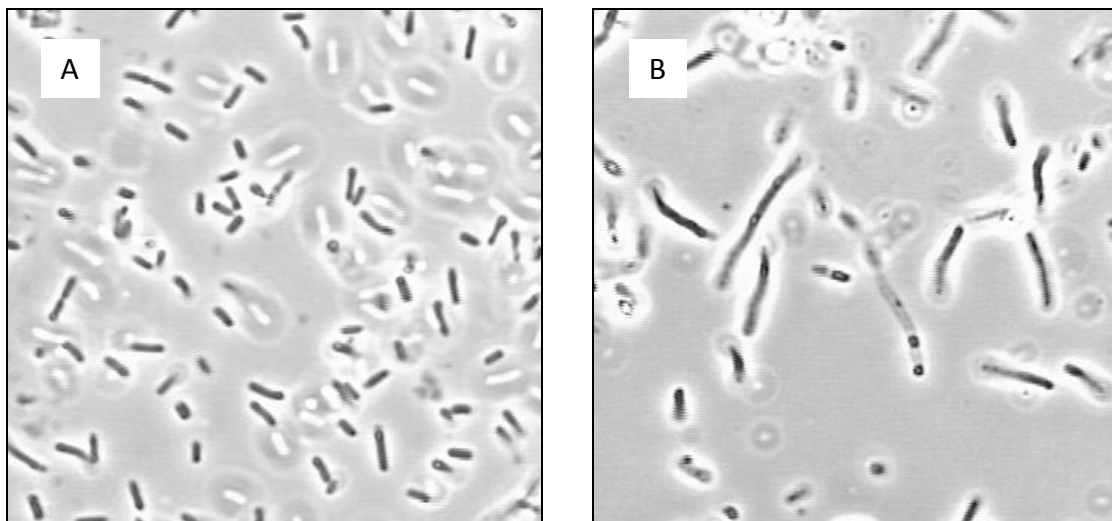


Abbildung 16: Abbildung der *E. coli*-Zellen nach 4-tägigem Wachstum in Hauptkultur (A) und Vorkultur (B) bei gleicher Vergrößerung (Volumen Hauptkultur 200 ml, Volumen Vorkultur 50 ml)

Insgesamt zeigte sich, dass die Cry1Ab-Toxinausbeute bei Halbierung des Komplexnährstoffgehaltes (Hefe/Trypton) im Medium um 30 % (Medium C) und bei der Kultivierung ohne Komplexnährstoffe (Medium D) um 55 % abnahm. Die Vitaminzugabe (Vergleich Medium A und B) hatte dagegen keinen messbaren Einfluss auf die Cry1Ab-Toxinausbeute. Deshalb wurde das Kapralekmedium ohne Vitamine (Medium B) zur Produktion von ^{14}C -markiertem Cry1Ab ausgewählt, da hier die gleiche Toxinmenge wie in Medium A erreicht wurde.

4.3.1.2 Reduzierung der Kohlenstoffquelle im Medium

Die ^{14}C -Markierung des Cry1Ab sollte hauptsächlich durch den Austausch der im ausgewählten Medium enthaltenen Kohlenstoffquelle Glycerin in ^{14}C -Glycerin erfolgen. Für die effiziente Nutzung des ^{14}C -Glycerins erschien es notwendig diese Kohlenstoffquelle soweit wie möglich zu limitieren, ohne jedoch die Cry1Ab-Ausbeute zu beeinflussen. Deshalb wurde im Kapralekmedium ohne Vitamine die Anfangskonzentrationen des Glycerins im Medium schrittweise verringert und die Cry1Ab Ausbeute quantifiziert. Dafür wurde die C-Quelle von 2 % (v/v) Glycerin auf 1 % (v/v) und 0,5 % (v/v) reduziert und das Zellwachstum sowie die Bildung von Cry1Ab untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 17 und Tabelle 13 dargestellt.

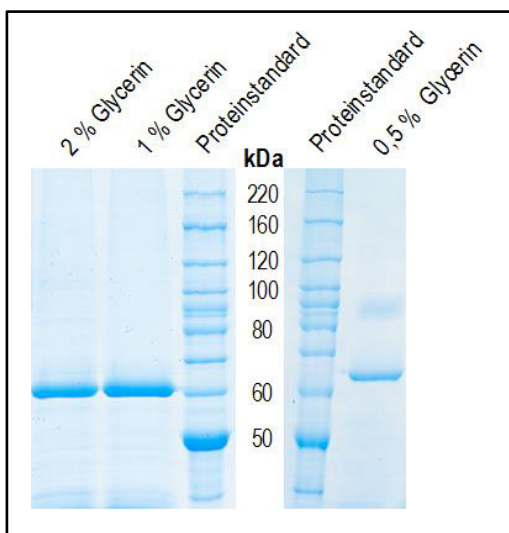


Abbildung 17: SDS-Gel mit Cry1Ab-Banden zum Vergleich der Cry1Ab-Qualität nach unterschiedlicher Kohlenstoffzugabe im Medium (aufgetragen auf zwei SDS-Gelen)

Unabhängig von der Glycerin-Konzentration ergaben sich in allen Fällen gute Produktausbeuten für Cry1Ab, wie an den deutlichen Banden bei etwa 60 kDa ersichtlich ist. Während sich die Banden bei 2 % und 1 % Glycerinzugabe nicht deutlich in ihrer Intensität nach der Anfärbung unterschieden, erschien die Bande aus dem Medium mit 0,5 % Glycerin vergleichsweise schwächer. Bei den Ansätzen mit 2 % und 1 % Glycerin zeigten sich außerdem schwache Banden im Bereich von 40 kDa. Dabei handelte es sich

vermutlich um Cry1Ab-Bruchstücke. Derartige Bruchstücke zeigten sich auch bei der Cry1Ab-Produktion in Untersuchungen von Nguyen & Jehle (Nguyen & Jehle 2004; Jehle, 2006).

Tabelle 14: Zum Medium zugegebene Kohlenstoffmengen sowie die resultierenden Cry1Ab-Mengen, quantifiziert mit *BCA-Protein-Assay-Kit*, angegeben mit Standardabweichung

Anfangskonzentration der C-Quelle Glycerin (v/v)	Cry1Ab Ausbeute [mg]*
2 %	4,2 ($\pm 1,0$)
1 %	4,3 ($\pm 0,8$)
0,5 %	2,6 ($\pm 1,2$)

*absolute Menge aus 200 ml Kulturansatz

Die in den SDS-Gelen bereits angedeuteten Unterschiede in der Ausbeute in Abhängigkeit von der Glycerin-Anfangskonzentration bestätigten sich bei der Proteinquantifizierung mit *BCA-Protein-Assay* (siehe Tabelle 14). Die Ausbeute von etwa $4 \text{ mg} \pm 1 \text{ mg}$ Cry1Ab bei einer Glycerinzugabe von 2 % lag, wie erwartet, im gleichen Bereich wie die Cry1Ab-Ausbeute im Kapralekmedium ohne Vitamine bei Auswahl des Mediums (etwa $3,2 \text{ mg}$ Cry1Ab; siehe Kapitel 2, Abschnitt 4.3.1.1, Medium B). Die Halbierung des Glyceringehaltes im Medium auf 1 % zeigte keine Auswirkung auf die Cry1Ab-Ausbeute. Erst bei der Reduzierung des Glycerinanteils auf ein Viertel der Ausgangskonzentration (0,5 % (v/v)) sank die Cry1Ab-Ausbeute um 40 %.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für die Synthese von ^{14}C -markiertem Cry1Ab als Kultivierungsmedium Kapralekmedium ohne Vitaminzugabe mit einer Kohlenstoffzugabe von 1 % (v/v) Glycerin ausgewählt.

4.3.2 ^{14}C -Markierung des Cry1Ab

Ziel der ^{14}C -Markierung des Cry1Ab war es, eine möglichst hohe Aktivität des Cry1Ab zu erreichen, um damit gleichzeitig eine hohe Sensitivität der geplanten Studien zum Abbau von Cry1Ab im Boden zu erhalten. Die Markierung des Cry1Ab erfolgte in vier sukzessiven Ansätzen, jeweils durch Zugabe von ^{14}C -markiertem Glycerin mit einer Ausgangsaktivität von $55 \mu\text{Ci}$ als Kohlenstoffquelle. Um die spezifische Aktivität der ^{14}C -Markierung zu steigern wurde in zwei weiteren Ansätzen die ^{14}C -Glycerinmenge verdoppelt und zusätzlich die für den ausgewählten *E. coli* Stamm essentielle Aminosäure Leucin ^{14}C -markiert hinzugefügt und so die Ausgangsaktivität auf $125 \mu\text{Ci}$ erhöht. Zur Ermittlung des Verbleibs der eingesetzten ^{14}C -Radioaktivitätsmengen wurden Massenbilanzen erstellt, indem nicht nur das ^{14}C -Cry1Ab sondern auch das ^{14}C - CO_2 , das im Medium verbliebene ^{14}C und das bei der Aufarbeitung des Cry1Ab verlorene ^{14}C mit erfasst wurde.

4.3.2.1 ^{14}C -Massenbilanzen

Die Massenbilanzen für die sechs im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Inkubationen zur Herstellung von ^{14}C -Cry1Ab sind in der Tabelle 15 dargestellt.

Die Ansätze 1 bis 4 mit einer zugegebenen Aktivität von 55 μCi und einer Inkubationsdauer von vier Tagen zeigten ähnliche Anteile an ^{14}C in den einzelnen Fraktionen. Während des Wachstums der Zellkultur wurden durchschnittlich 55 % des zugegebenen ^{14}C von den *E. coli*-Zellen zu CO_2 metabolisiert. Nach der Aufreinigung des ^{14}C -Cry1Ab befanden sich noch durchschnittlich 21 % im Restmedium und 15 % in den Produktionsresten. Aus den Ansätzen 1 bis 4 wurden im Mittel 3,42 mg ^{14}C -Cry1Ab mit einer Aktivität von 31.580 dpm gewonnen. Aus dem Ansatz 3 wurde nur 1 mg ^{14}C -Cry1Ab hergestellt. Diese im Vergleich zu den anderen Ansätzen geringe Menge Cry1Ab beruhte vermutlich auf einer schwächeren Entwicklung von Proteineinschlusskörpern in den *E. coli*-Zellen, die jedoch mit keiner experimentellen Variablen hier erklärt werden konnte und möglicherweise auf Fehler bei der Aufreinigung des Proteins zurückzuführen war. Die spezifische Aktivität des ^{14}C -Cry1Ab in den Ansätzen 1 bis 4 lag zwischen 6.375 dpm mg^{-1} und 16.060 dpm mg^{-1} .

In den Ansätzen 5 und 6, bei denen die zugegebene Radioaktivitätsmenge auf 125 μCi erhöht war, ergaben sich andere Ergebnisse. In Ansatz 5 war die geerntete Biomasse 41 % geringer als in den Ansätzen 1 bis 4 und es wurde 17 % weniger ^{14}C metabolisiert. Die nach der Aufarbeitung erhaltene Cry1Ab-Menge lag mit 3,1 mg jedoch im gleichen Bereich. Die geringere Biomasse sowie die geringere Metabolisierung sind wahrscheinlich ein Effekt der erhöhten zellschädigenden radioaktiven Strahlung. Bei der mikroskopischen Untersuchung erschienen die *E. coli*-Zellen deutlich kleiner als in den Ansätzen 1 bis 4 (Daten nicht gezeigt). Im Restmedium befand sich jedoch mit 25 % genauso viel ^{14}C . In den Produktionsresten wurde ein 10 % höherer Wert für ^{14}C ermittelt. Aus Ansatz 5 wurde letztendlich ^{14}C -Cry1Ab mit einer Gesamtaktivität von 3.380 dpm und einer spezifischen Aktivität von 1.090 dpm mg^{-1} erzielt. Das war deutlich weniger als in den Ansätzen 1 bis 4 mit einer geringeren Zugabeaktivität.

Um den negativen Einfluss der erhöhten Radioaktivität auf das Wachstum der *E. coli*-Zellen möglicherweise zu kompensieren, wurde im Ansatz 6 die Kultivierungszeit von 96 h auf 144 h erhöht. Die geerntete Biomasse (1,6 g FG) und die resultierende Menge Cry1Ab (4,2 mg) lagen jedoch im gleichen Bereich wie bei Ansatz 5. Im Restmedium verblieben 7 % mehr Radioaktivität als im Ansatz 5 und in den Produktionsresten 7 % weniger. In Ansatz 6 ergab sich mit der verlängerten Kultivierungszeit im Vergleich zu Ansatz 5 jedoch eine 45-fach höhere Gesamtaktivität des ^{14}C -Cry1Ab von 150.570 dpm mit einer spezifischen Aktivität von 35.850 dpm mg^{-1} .

Tabelle 15: ^{14}C -Massenbilanzen zur Ermittlung der Wiederfindungsraten im Zusammenhang mit der Synthese von ^{14}C -Cry1Ab durch den rekombinanten *E. coli*-Stamm HB101pMP aus verschiedenen 200 ml Kultivierungsansätzen

Syntheseansatz	1	2	3	4	\bar{x} (von 1 - 4)	5	6
Inkubationsdauer	96 h	96 h	96 h	96 h	96 h	96 h	144 h

E. coli-Biomasse und resultierende Cry1Ab-Menge:

Geerntete Biomasse [g FG]	1,8	2,74	2,71	2,73	$2,5 \pm 0,5$	1,46	1,6
Cry1Ab [mg]	5,1	2,8	1	4,8	$3,4 \pm 1,9$	3,1	4,2

Radioaktivität der ^{14}C -enthaltenden Fraktionen während der Synthese von Cry1Ab (in dpm):

Eingesetzte Aktivität	$112 \cdot 10^{6**}$	$112 \cdot 10^{6**}$	$112 \cdot 10^{6**}$	$112 \cdot 10^{6**}$	$(112 \pm 0,00) \cdot 10^{6**}$	$285 \cdot 10^{6*}$	$285 \cdot 10^{6*}$
^{14}C in CO_2	$58 \cdot 10^6$	$59 \cdot 10^6$	$66 \cdot 10^6$	$64 \cdot 10^6$	$(62 \pm 4) \cdot 10^6$	$108 \cdot 10^6$	$128 \cdot 10^6$
^{14}C im Restmedium (abzentrifugiert)	$21 \cdot 10^6$	$22 \cdot 10^6$	$28 \cdot 10^6$	$23 \cdot 10^6$	$(24 \pm 3) \cdot 10^6$	$72 \cdot 10^6$	$76 \cdot 10^6$
^{14}C in den Produktionsresten***	$21 \cdot 10^6$	$16 \cdot 10^6$	$14 \cdot 10^6$	$16 \cdot 10^6$	$(17 \pm 3) \cdot 10^6$	$72 \cdot 10^6$	$52 \cdot 10^6$
Gesamte Cry1Ab-Aktivität	42.320	37.340	16.060	30.600	31.600 ± 11.500	3.380	150.570

Wiederfindung des ^{14}C während des Wachstums und der Aufreinigung des Cry1Ab (in % der Ausgangsaktivität):

metabolisiertes ^{14}C in CO_2	50	54	58	56	55 ± 3	38	45
Restmedium (abzentrifugiert)	18	20	25	20	21 ± 3	25	26
Produktionsreste***	18	14	12	14	15 ± 3	25	18
Cry1Ab-Aktivität	0,036	0,034	0,014	0,027	$0,03 \pm 0,01$	0,001	0,052
Wiederfindungsrate des ^{14}C	88	88	95	90	90 ± 3	89	89

spezifische Cry1Ab-Aktivität [dpm mg^{-1} Cry1Ab]	8.300	13.335	16.060	6.375	11.000 ± 4.500	1.090	35.850
---	-------	--------	--------	-------	--------------------	-------	--------

* entspricht 125 μCi ; ** entspricht 55 μCi ; *** während der Aufreinigung anfallende ^{14}C -Reste (Waschüberstände, Pelletreste, vgl. Kapitel 2, Abschnitt 4.2.1.3 und 4.2.1.4)

Die Wiederfindungsrate des eingesetzten ^{14}C lag bei allen Ansätzen im Bereich von 90 %. Die restlichen 10 % gingen vermutlich bei den verschiedenen Aufreinigungsschritten des Cry1Ab-Proteins verloren.

4.3.2.2 Bewertung des ^{14}C -Cry1Ab mit SDS PAGE

Die Qualität des hergestellten ^{14}C -Cry1Ab wurde für alle Syntheseansätze durch SDS-PAGE-Analysen untersucht. Dafür wurden jeweils das Protoxin und das nach dem Trypsinisierungsschritt erhaltene Toxin auf das gleiche SDS-Gel aufgetragen. Die SDS-Gele für alle Ansätze sind in Abbildung 18 dargestellt.

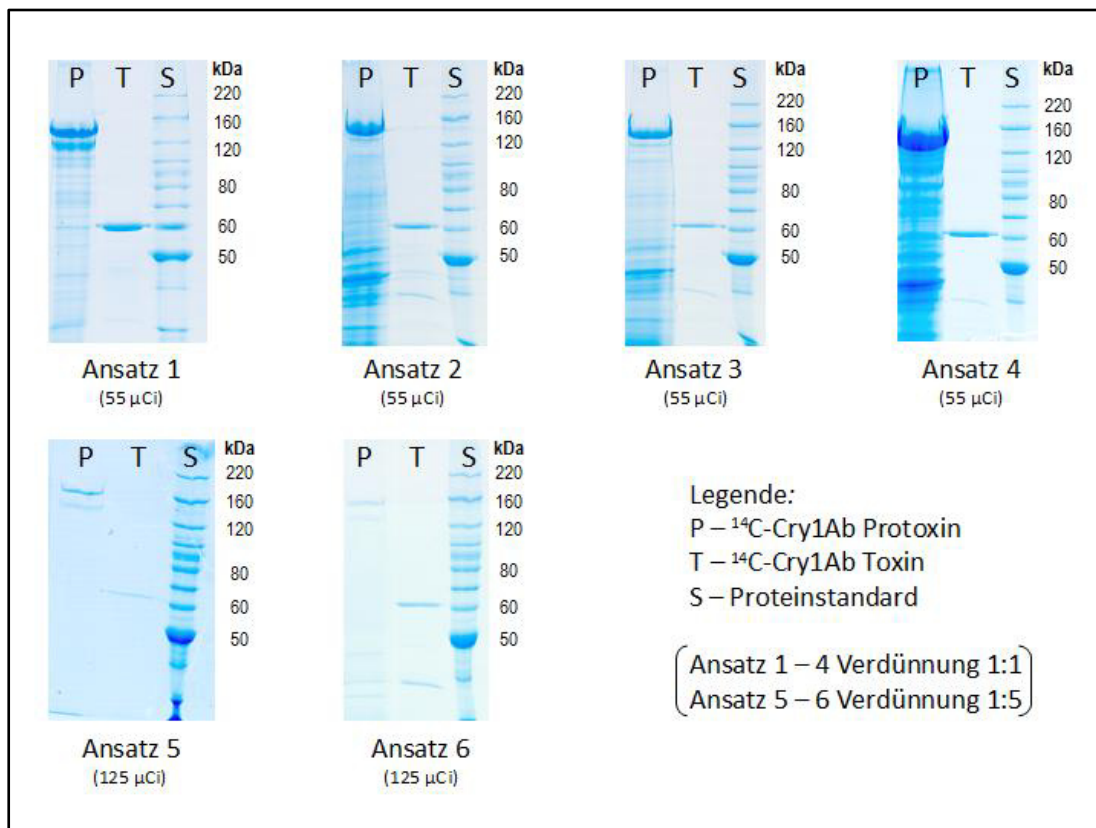


Abbildung 18: SDS-Gele von ^{14}C -Cry1Ab-Protoxin und Toxin aus allen Produktionsansätzen

In allen Ansätzen zeigten sich deutliche Protoxinbanden bei ca. 130 kDa und Toxinbanden bei 60 kDa. In den Spuren mit den Protoxinbanden sind Banden, die offensichtlich von anderen Zellproteinen stammten, zu erkennen. Diese Proteinverunreinigungen wurden durch die anschließende Trypsinisierung jedoch entfernt, so dass lediglich das 60 kDa große, trypsinresistente Cry1Ab verblieb. Die nach der Trypsinisierung aufgetragenen Proben wiesen neben der Cry1Ab-Toxinbande in Ansatz 2, 3, 4 und 6 eine weitere, schwächere Bande bei etwa 40 kDa auf. Diese schwächere Bande war vermutlich auf ein Bruchstück des Cry1Ab zurückzuführen und wurde auch schon von Nguyen & Jehle (2004)

beobachtet. Das hergestellte ^{14}C -Cry1Ab war demnach frei von anderen Proteinen und konnte für weitere Untersuchungen verwendet werden.

Die schwächeren Cry1Ab bzw. Protoxin-Banden in den Ansätzen 5 und 6 waren auf eine höhere Verdünnung der aufgetragenen Lösungen zurückzuführen. Zudem zeigten sich bei beiden Ansätzen deutlich weniger begleitende, verunreinigende Banden.

4.3.2.3 Beobachtete Auswirkungen der radioaktiven Strahlung auf die Zellmorphologie und die Ausbildung von Proteineinschlusskörpern

Neben der Bilanzierung der ^{14}C -Anteile wurde das Wachstum der *E. coli*-Zellen in allen Ansätzen mikroskopisch untersucht. Dabei zeigte sich ein deutlicher Unterschied im Zellwachstum zwischen den Ansätzen mit niedriger und hoher ^{14}C -Zugabe. In den Kulturen mit der höheren Radioaktivität war das Zellwachstum verlangsamt und die Zellteilung verzögert. Nach der Zellteilung blieben die Zellen in „Zellketten“ miteinander verbunden und die einzelnen Proteineinschlusskörper erschienen wesentlich kleiner als in den Ansätzen mit niedrigerer Radioaktivität. Vermutlich würde eine weitere Erhöhung der Radioaktivität die beobachteten Effekte verstärken und zu weiteren Defekten in den Zellen führen. Auch bei Schmidt (1948) wurden ähnliche strahlungsbedingte Effekte auf *E. coli*-Zellkulturen beobachtet.

4.3.2.4 Reinheit des ^{14}C -Cry1Ab

Die Reinheit des hergestellten ^{14}C -Cry1Ab wurde durch graphische Auswertung der entsprechenden SDS-Gele über manuelle Pixelintegration abgeschätzt. Die aus den Proteinbanden (siehe Abbildung 18) ermittelten Pixelintensitäten sind in Abbildung 19 für alle Ansätze dargestellt. Die Reinheit des hergestellten ^{14}C -Cry1Ab liegt demnach zwischen 81 - 99 % (w/w).

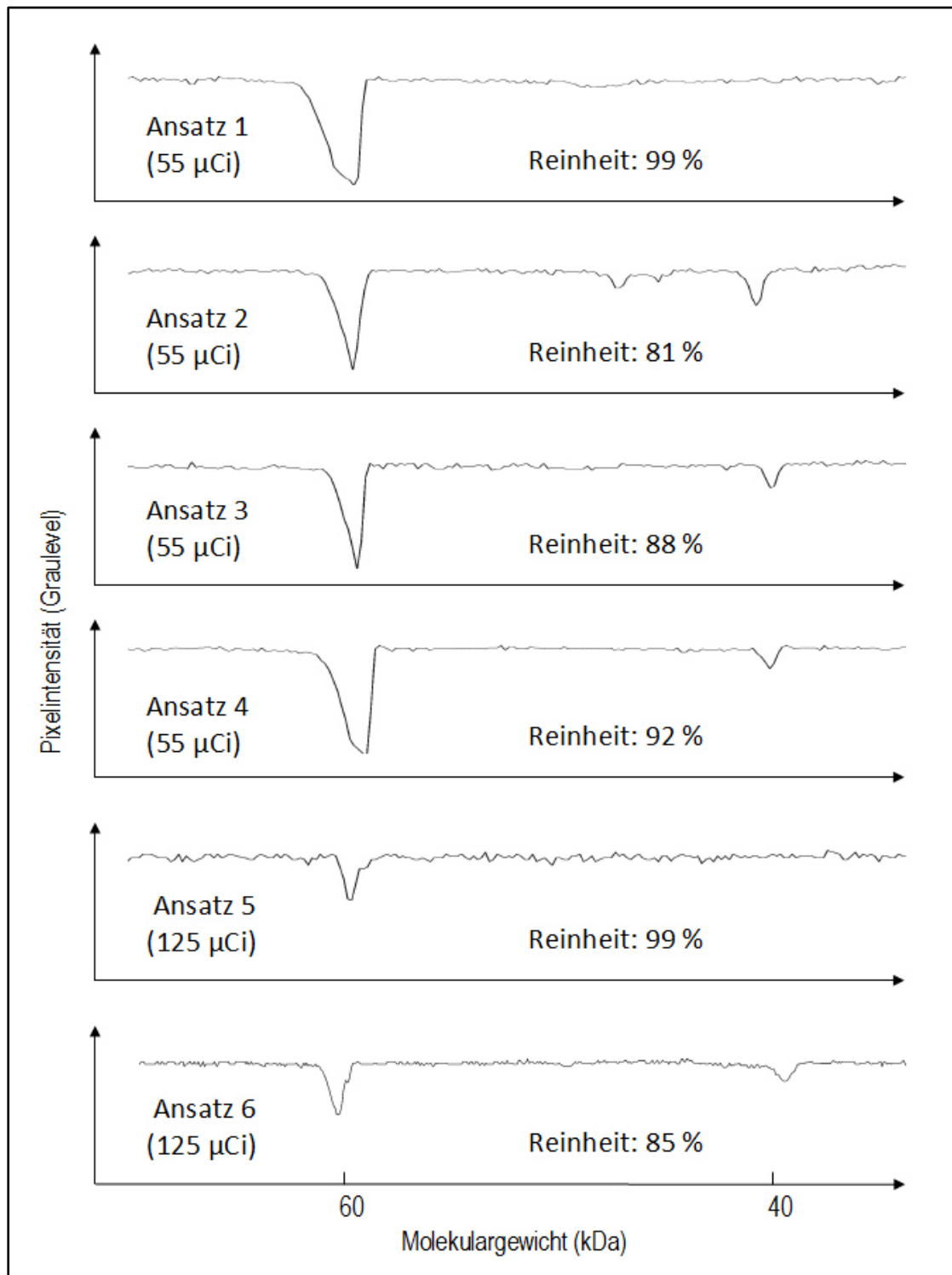


Abbildung 19: Auftragung der Pixelintensitäten über dem Molekulargewicht zur graphischen Abschätzung der Reinheit des ^{14}C -Cry1Ab in Gew.-%

4.4 Diskussion

Das Markieren von Verbindungen mit dem radioaktiven Isotop ^{14}C oder anderen radioaktiven Elementen ist eine gängige Methode den Verbleib und Stoffwechsel auch in komplexen Systemen mit vielen anderen chemischen Verbindungen, wie sie etwa im Boden vorkommen zu untersuchen (Stolz, 2005; Richter, 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde ^{14}C -Cry1Ab mit Hilfe des rekombinanten *E. coli*-Stammes HB101 hergestellt, um es für Abbauuntersuchungen in Böden (vgl. Kapitel 3 dieser Arbeit) zur Verfügung zu stellen. Die Produktion von rekombinanten Proteinen in *E. coli* mit Hilfe von Einschlusskörpern (*Inclusion bodies*), wobei das Protein in inaktiver Konformation im Bakterium aggregiert wird und eine spätere Aktivierung erfordert, ist eine etablierte Methode (Paul *et al.*, 1983; Clark, 2001; Middelberg, 2002; Fahnert *et al.*, 2004; Vallejo & Rinas, 2004; Jungbauer & Kaar, 2007). Im pharmazeutischen Bereich wird beispielsweise Insulin auf diese Weise industriell hergestellt (Walsh, 2005).

Durch die Kultivierung des *E. coli*-Stammes HB101 pMP mit ^{14}C -Glycerin und ^{14}C -Leucin als Kohlenstoffquelle wurde eine maximale Markierung des Cry1Ab-Proteins von 35.850 dpm pro mg Cry1Ab erreicht. Das Verhältnis der Cry1Ab-Menge, quantifiziert über Proteinmessungen, zur Gesamtbiomasse (ca. 1:575) entspricht etwa dem Verhältnis von ^{14}C -Cry1Ab-Radioaktivität zur ^{14}C -Radioaktivität der restlichen Cry1Ab-freien Zellmasse (ca. 1:500). Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass die Zellen gleichmäßig mit ^{14}C markiert wurden. Die hergestellten ^{14}C -Cry1Ab-Mengen lagen mit durchschnittlich $0,018 \pm 0,007 \text{ mg ml}^{-1}$ (Angabe in Proteingewicht pro Kulturvolumen) im gleichen Bereich wie die in Vorversuchen unter gleichen Inkubationsbedingungen ohne ^{14}C -Zugabe erreichten Cry1Ab-Mengen von $0,021 \pm 0,004 \text{ mg ml}^{-1}$. Es zeigten sich somit keine Unterschiede in den produzierten Cry1Ab-Mengen zwischen Ansätzen mit und ohne radioaktiven Kohlenstoffquellen. Auch bei Nguyen (2004) wurden unter ähnlichen Inkubationsbedingungen (3 Tage Inkubationsdauer, TB-Medium) übereinstimmende Cry1Ab-Mengen von $0,008 \text{ mg ml}^{-1}$ bis $0,04 \text{ mg ml}^{-1}$ erreicht. Von Accinelli *et al.* (2008) wurden Cry1Ac-Proteine mit ^{14}C Markierung hergestellt. Hierbei wurde ^{14}C -Glucose zur Kultivierung des *E. coli*-Stammes JM103 benutzt und ebenfalls erfolgreich ^{14}C -markiertes Cry-Protein für Bodenuntersuchungen gewonnen, ohne allerdings genauere Angaben zur Reinheit und Ausbeute gemacht zu haben.

Eine 2,5-fache Erhöhung der zugegebenen Aktivität führte in den eigenen Untersuchungen zu einer 3,2-fach höheren spezifischen Aktivität des produzierten Cry1Ab. Es wurde jedoch mit Erhöhung der Aktivität eine Schädigung der *E. coli*-Zellen in der Produktions-

kultur beobachtet. Zudem war die Wachstumsgeschwindigkeit herabgesetzt, so dass die Inkubationsdauer für die Gewinnung der etwa gleichen Biomasse verdoppelt werden musste. Dabei war zu berücksichtigen, dass der Prozess der Proteineinschlusskörperbildung reversibel ist und eine zu lange Kultivierungszeit wieder zum Abbau der Proteineinschlusskörper führen kann (Carrio & Villaverde, 2001). Der negative Einfluss der Radioaktivität auf das Wachstum von Mikroorganismen ist für unterschiedliche Bakterien bereits hinlänglich untersucht und bekannt (Beispiele: Pacinnoti & Porcelli, 1899; Pfeiffer & Friedberger, 1903; Lea *et al.*, 1937; Aschkinass *et al.*, 1901). Eine weitere Erhöhung der Radioaktivitätsmenge im Kulturmedium würde somit wahrscheinlich zu keiner wesentlichen Verbesserung der ^{14}C -Cry1Ab-Qualität und Quantität führen. Möglicherweise werden auch die chemischen Bindungen innerhalb des Cry1Ab-Proteins selbst durch den Einbau von ^{14}C instabiler, denn radioaktive Strahlung kann chemische Bindungen negativ beeinflussen (Gamarnik, 2006; Negi & Anand, 1986).

Die Biosynthese von ^{14}C -markierten Verbindungen mit Hilfe von Bakterien wurde bereits vor mehr als 40 Jahren für die Herstellung von Tuberculin PPD durch *Mycobacterium tuberculosis* genutzt (Landi *et al.*, 1967). Zur Markierung wurden damals ^{14}C -Glutaminsäure und ein Gemisch aus ^{14}C -Aminosäuren (Säurehydrolysat des ^{14}C -Chlorellaproteins) dem Nährmedium in zwei verschiedenen Aktivitäten ($0,4 \mu\text{Ci ml}^{-1}$ und $1,3 \mu\text{Ci ml}^{-1}$) zugegeben. Die hier bei der Produktion von ^{14}C -Cry1Ab genutzten Aktivitäten lagen mit $0,3$ bis $0,6 \mu\text{Ci ml}^{-1}$ in einem ähnlichen Bereich. Die mit *M. tuberculosis* nach Zugabe von $0,4 \mu\text{Ci ml}^{-1}$ erreichten spezifischen Aktivitäten des Tuberculin lagen zwischen 5.000 und $15.600 \text{ dpm mg}^{-1}$ Protein und bei $1,3 \mu\text{Ci ml}^{-1}$ sogar bei einer spezifische Aktivität von $92.800 \text{ dpm mg}^{-1}$. Ähnliche Ausbeuten wurden in den eigenen Untersuchungen hier erzielt: 6.375 bis $16.060 \text{ dpm mg}^{-1}$ Protein bei $0,3 \mu\text{Ci ml}^{-1}$ und $35.850 \text{ dpm mg}^{-1}$ Protein bei $0,6 \mu\text{Ci ml}^{-1}$. Bei der Synthese mit *M. tuberculosis* trat im Gegensatz zu den eigenen Synthesen mit *E. coli* keine Beeinträchtigung des Wachstums oder Schädigung der Bakterienzellen auf, was wahrscheinlich mit einer erhöhten Strahlungsresistenz des grampositiven *M. tuberculosis* im Vergleich zu *E. coli* korreliert. Eine schwächere Strahlenresistenz bei dem *E. coli*-Stamm kann vermutet werden, da dieser recA-minus Mutationen, die für die Reparatur von DNA Schäden eine Bedeutung haben, besitzt (Takahashi *et al.*, 1996).

In einer anderen Untersuchung gelang es Landi *et al.* (1970) durch die Optimierung der Wachstumsbedingungen ohne Erhöhung der gesamten Zugabeaktivität, durch einen Anteil von $1 \mu\text{Ci ml}^{-1}$ ^{14}C -Aminosäuren, in sieben verschiedenen Bakterienkulturen mit *Mycobacterium spec.* die spezifische Aktivität des gewonnenen Proteins auf bis zu

342.000 dpm mg^{-1} zu erhöhen. Diese Aktivität ist etwa vier bis neunmal höher als die hier bei ^{14}C -Cry1Ab erreichte spezifische Aktivität. Ein Ansatz die spezifische Aktivität des ^{14}C -Cry1Ab weiter zu erhöhen wäre demnach möglicherweise die Verwendung von ^{14}C -markierten Hefe- und Tryptonanteilen. Außerdem könnte eine höhere Markierung durch die Verwendung weiterer ^{14}C -markierter Aminosäuren zum Kulturmedium erreicht werden. Bereits verfügbare Aminosäuren werden von den Zellen aufgrund des niedrigeren energetischen Aufwandes bevorzugt in Proteine eingebaut anstatt aus einer markierten ^{14}C -Kohlenstoffquelle selbst neue Aminosäuren zu bilden.

Die in dieser Untersuchung erreichte Höhe der radioaktiven Markierung mit 8.000 bis 36.000 dpm mg^{-1} (0,004 bis 0,02 μCi) sowie die Reinheit des Proteins erscheinen ausreichend, um einen Wissensgewinn in anschließenden Untersuchungen zum Abbau des Cry1Ab im Boden erzielen zu können. Für die Verfolgung des ^{14}C beim Abbau des Cry1Ab ist es wichtig, dass die zu messende Radioaktivität des ^{14}C in den Proben sich signifikant von den Kontrollproben (Boden ohne Cry-Proteine) abhebt, welche bei durchschnittlich 16 dpm mg^{-1} lag. Die Reinheit des Proteins mit durchschnittlich 86 %, liegt im gleichen Bereich wie bei Nguyen (2004). Die Verunreinigung von durchschnittlich 14 %, bei der es sich vermutlich um Cry1Ab-Bruchstücke handelte (Nguyen, 2004; Jehle, 2006), muss bei der Analyse von Untersuchungen zum Verbleib von Cry1Ab mit der hier markierten Substanz berücksichtigt werden. Für die weitere Untersuchung des ^{14}C -Cry1Ab-Abbaus im Boden wurde die ^{14}C -Cry1Ab-Charge aus Ansatz 6 mit 4,2 mg, einer Gesamtaktivität von 150.570 dpm und einer Reinheit von 85 Gew.-% ausgewählt, sowie eine Kombination aus dem ^{14}C -Cry1Ab der Ansätze 1 und 2, aus der sich eine ^{14}C -Cry1Ab-Charge mit 7,9 mg Cry1Ab, 79.660 dpm Gesamtaktivität und einer durchschnittlichen Reinheit von 90 Gew.-% ergab. Die ^{14}C -Cry1Ab-Chargen aus den übrigen Ansätzen eigneten sich aufgrund eines zu geringen Cry1Ab-Gehaltes (Ansatz 3) oder zu geringer spezifischer Aktivitäten (Ansatz 4 und 5) nicht für die weiterführenden Untersuchungen.

5 Abbau von Cry1Ab im Boden

5.1 Einleitung

Bei der landwirtschaftlichen Nutzung des BT-Mais MON810 gelangen rekombinante, insektizide Cry1Ab Proteine über Wurzeln und Pflanzenreste nach der Ernte in die Böden. Obschon durch eine Reihe von Laboruntersuchungen der Abbau von Cry1Ab in Böden bereits untersucht wurde, blieben wichtige Fragen bisher unbeantwortet. Bei den bisherigen Untersuchungen wurde das Protein entweder direkt auf molekularer Ebene mit Hilfe von ELISA-Verfahren nachgewiesen oder indirekt über die biologische Wirksamkeit mit sog. Bioassays. Bei den ELISA-Verfahren hängt die Detektierbarkeit der Verbindung stark vom Extraktionsmittel, mit dem das Protein aus der Bodenmatrix gelöst wird, ab. Außerdem kann dabei nicht ausgeschlossen werden, dass die im ELISA-Test eingesetzten Antikörper auch Zwischenprodukte des Abbaus detektieren (Paul *et al.*, 2010). Zuverlässiger zur Quantifizierung intakter, funktioneller Cry1Ab Proteine sind Bioassays, bei denen lebende Organismen (Zielorganismen, in diesem Fall also vor allem Lepidopteren, wie Maiszünslerlarven) mit dem Extrakt inkubiert werden. Derartige Nachweise sind jedoch deutlich unempfindlicher, da sie Konzentrationen unterhalb der Toxizität nicht detektieren (Tapp & Stotzky, 1998; Dubelman *et al.*, 2005). Je nach angewandter Nachweismethode ergaben sich bei Untersuchungen zum Cry1Ab-Abbau im Boden unterschiedliche, zum Teil sogar widersprüchliche Ergebnisse. So wurde von biologischem Abbau bei gleichzeitiger Adsorption von Cry1Ab an den Boden ausgegangen (Creccio & Stotzky, 1998, 2001; Saxena *et al.*, 2002a; Flores *et al.*, 2005; Hopkins & Gregorich, 2003, 2004; Palm *et al.*, 1996; Zwahlen *et al.*, 2003), aber auch eine zumindest teilweise irreversible Adsorption angenommen (Saxena *et al.*, 2001a; Chevallier *et al.*, 2001). In einigen Böden wurde sogar eine vollständige Mineralisation des Cry1Ab vermutet (Marchetti *et al.*, 2007; Dubelmann *et al.*, 2005). Andererseits wurde in verschiedenen Studien über eine mögliche Anreicherung des Cry1Ab-Proteins im Boden sowie eine Verlagerung in tiefere Bodenschichten diskutiert (Tapp & Stotzky, 1995; Saxena *et al.*, 2002a; Wang *et al.*, 2006; Hopkins & Gregorich, 2003). Genaue Aussagen zum Verhalten des Proteins im Boden waren aufgrund der Limitierung durch die Detektionsmethoden bisher offensichtlich nicht möglich.

Ziel der Arbeiten in diesem Kapitel war es deshalb, den Abbau des Cry1Ab in landwirtschaftlich genutztem Boden mit Hilfe der ^{14}C -Markierung des Proteins unter Laborbedingungen genau zu verfolgen. Um einen möglichen Einfluss der Adsorption auf den Ab-

bau zu berücksichtigen (siehe Kapitel 1, Abschnitt 4.6), wurden zwei Böden ausgewählt, die sich hauptsächlich in ihrem Ton- und Sandgehalt und den davon abhängigen Parametern (z.B. Kationenaustauschkapazität) unterschieden. Es wurden ^{14}C -Massenbilanzen über die $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzung, den ^{14}C -Gehalt der Bodenbiomasse, das aus dem Boden extrahierbare ^{14}C sowie das im Boden verbliebene Rest- ^{14}C aufgestellt und somit Erkenntnisse zum Verbleib des ^{14}C -Cry1Ab nach einem 30-tägigem Abbau gewonnen. Aus den betrachteten Parametern konnte der tatsächliche abgebaute Anteil des ^{14}C -Cry1Ab sowie der adsorbierte Anteil berechnet werden. Zusätzlich wurden mögliche Auswirkungen des Cry1Ab auf die Vielfalt der dominanten Bodenbakterien mit Hilfe von kultivierungsunabhängigem genetischen Fingerprinting durch PCR-amplifizierte 16S rRNA Gene beispielhaft ermittelt. Dabei kam die SSCP-Technik zum Einsatz (Schwieger & Tebbe, 1998).

5.2 Material und Methoden

5.2.1 Böden

Für die Untersuchung zum Abbau von Cry1Ab wurden zwei typische, für den Maisanbau genutzte Böden des Oderbruchs in Deutschland ausgewählt. Dabei handelte es sich um einen Auensand mit fluvialer Genese (schwach toniger Sand) und einen kolluvialen Auenlehm (sandig tonigen Lehm). Beide Böden waren vollständig entkalkt. An keinem dieser Standorte wurde zuvor gentechnisch veränderter BT-Mais angebaut, so dass mit keinem Vorkommen von Cry1Ab Proteinen zu rechnen war. Tabelle 16 zeigt charakteristische Parameter der Böden, die im Rahmen des Freilandmonitorings (siehe Kapitel 1, Abschnitt 3.4) ermittelt wurden.

Tabelle 16: Charakteristische Bodenparameter der ausgewählten Böden

Bodenart	schwach toniger Sand (Standort F6)	sandig toniger Lehm (Standort F7)
Ton (< 0,002 mm) [%]	5 ± 2	36 ± 8
Schluff (0,002 - 0,063 mm) [%]	10 ± 2	13 ± 3
Sand (> 0,063 mm) [%]	85 ± 3	51 ± 10
Wasserhaltekapazität [g H ₂ O 100 g ⁻¹ Boden TG]	20 ± 2	39 ± 3
Kationenaustauschkapazität [mmol _c kg ⁻¹ Boden TG]	19 ± 12	235 ± 45
Gesamtkohlenstoffgehalt [Gew.-%]	0,7 ± 0,1	2,2 ± 0,5
Biomasse-Kohlenstoff [µg g ⁻¹ Boden TG]	110 ± 13	172 ± 37
pH-Wert (CaCl ₂)	5,0 ± 0,4	5,3 ± 0,2

Die Böden waren im pH-Wert sehr ähnlich, unterschieden sich jedoch erheblich in ihrer Kationenaustauschkapazität sowie der mikrobiellen Biomasse und im Gesamtkohlenstoffgehalt, die beide mit dem Tongehalt korrelierten. Die Böden wurden im August 2006 von den Kontrollflächen der Standorte F6 und F7 genommen, mit einem Analysensieb (Maschenweite 2 mm, Retsch GmbH, Haan) gesiebt und bei 4°C ungetrocknet im Dunkeln gelagert.

5.2.2 Untersuchung des ^{14}C -Cry1Ab-Abbaus im Boden

Der Abbau des ^{14}C -Cry1Ab wurde in zwei Versuchsansätzen (A und B) mit jeweils zwei unterschiedlichen Anfangsproteinkonzentrationen in beiden Böden untersucht. Der Verbleib des zugegebenen Proteins wurde mit ^{14}C -Massenbilanzen verfolgt, wobei zwischen dem ^{14}C im freigesetzten CO_2 , in der Bodenbiomasse sowie dem Rest- ^{14}C unterschieden wurde. Für den ^{14}C -Abbau und die jeweilige Kontrolle wurden jeweils 4 Parallelen angesetzt.

5.2.2.1 Zugabe des ^{14}C -Cry1Ab in den Boden

Das ^{14}C -markierte Cry1Ab wurde mit Hilfe des rekombinanten *E. coli*-Stammes HB101 pMP hergestellt (siehe Kapitel 2). Vor der Zugabe in den Boden wurde der pH-Wert der ^{14}C -Cry1Ab-Lösungen mit PBS-Puffer von pH 11 auf pH 8 reduziert, um eine Schädigung der Mikroorganismengemeinschaft in den Böden zu vermeiden. In einem Vorversuch wurde eine mögliche Zerstörung des Proteins durch die Neutralisation untersucht und ausgeschlossen. Es wurden jeweils 20 g (TG) ungetrockneter Boden mit einer Gesamtaktivität von 10.000 dpm ^{14}C -Cry1Ab versetzt. Dabei wurden die Böden durch Zugabe der entsprechenden Menge PBS-Puffer zur PBS-Proteinlösung auf eine Feuchte von 65 % ihrer maximalen Wasserhaltekapazität eingestellt. Die Zugabe der Proteinlösung erfolgte tropfenweise mit einer Kanüle, danach wurde der Boden durch manuelles Rühren vorsichtig durchmischt. Als Reaktionsgefäße für den Abbau dienten 50 ml Erlenmeyerkolben.

Tabelle 17: Gesamtmenge sowie spezifische Aktivität des zu dem Sandboden und Lehm Boden zugegebenen ^{14}C -Cry1Ab

	spezifische Aktivität des eingesetzten Cry1Ab [dpm mg ⁻¹]	zugegebene Gesamtaktivität [dpm]	Resultierende Cry1Ab- Konzentration [µg g ⁻¹ Boden TG]
Ansatz A	35.850	10.000	14
Ansatz B	10.084	10.000	50

In Tabelle 17 ist die resultierende Proteinkonzentration sowie die spezifische Aktivität der Proteinlösungen für Ansatz A und B dargestellt.

5.2.2.2 Versuchsaufbau

Der Abbau des Cry1Ab im Boden wurde in einem klimatisierten Raum bei 20°C im Dunkeln durch Erfassung des entstehenden $^{14}\text{CO}_2$ und anschließender Messung des im Boden verbliebenen ^{14}C untersucht. Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 20 schematisch dargestellt. Die Belüftung der Reaktionsgefäße erfolgte bei einer Rate von $6 - 7 \text{ ml s}^{-1}$ mit einem Kompressor (RS4 vacUÜbrand Drehschieber-Vakuumpumpe, Rudolf Brand GmbH & Co. Laborgeräte und Vakuumtechnik, Wertheim) mit einem nachgeschalteten Überlaufschutz und einer CO_2 -Falle. Die eingehende Luft wurde zuvor durch einen 40 cm langen mit NaOH-Plätzchen gefüllten Schlauch geleitet an den eine Waschflasche mit 150 ml 2 N NaOH angeschlossen war, um das bereits enthaltene CO_2 zu binden.

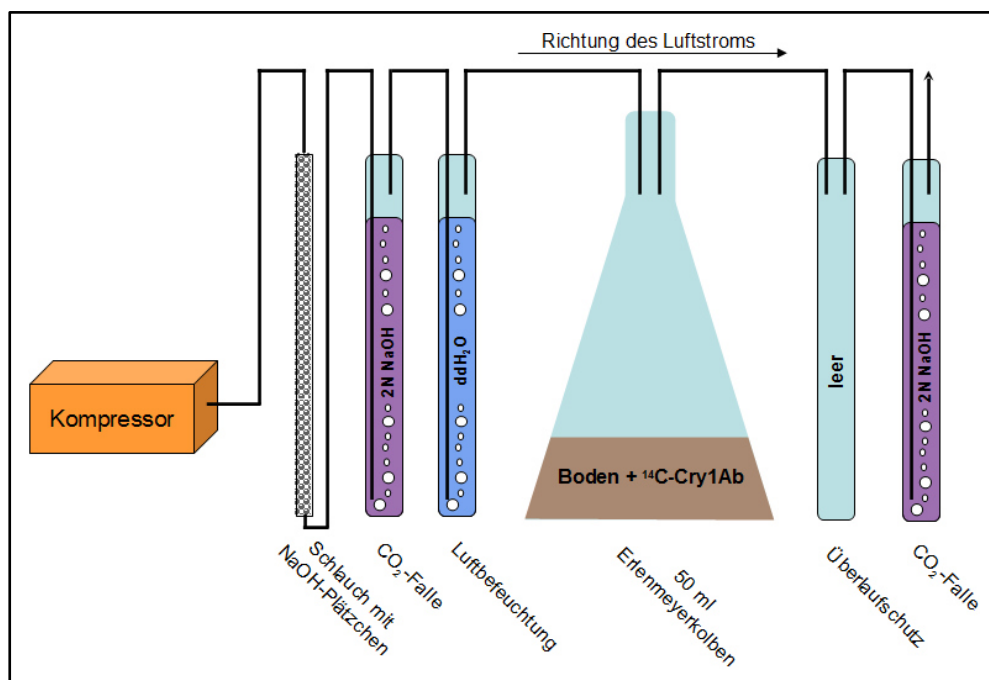


Abbildung 20: Schematische Übersichtsskizze zum Versuchsaufbau der ^{14}C -Cry1Ab Abbauversuche

Um eine Austrocknung der Böden in den Inkubationsgefäßen zu vermeiden, wurde die CO_2 -freie Luft zur Befeuchtung durch eine weitere Waschflasche mit 200 ml ddH₂O geleitet. Die so vorbereitete Luft wurde über Glasrechen (Sonderanfertigung, siehe Abbildung 21) gleichmäßig allen Bodenreaktoren zugeführt. Den Bodenreaktoren war jeweils ein Überlaufschutz (Reagenzglas 20 x 150 mm, Duran-Group GmbH, Wertheim) an den sich eine CO_2 -Falle mit 5 ml 2 N NaOH in einem Glasröhrchen (Sonderanfertigung) anschloss, nachgeschaltet. Die nachgeschalteten CO_2 -Fallen dienten zum Auffangen des

beim Cry1Ab-Abbau entstehenden $^{14}\text{CO}_2$ und wurden zu Beginn täglich, später wöchentlich, aufgrund der zunehmend niedrigeren CO_2 -Entwicklung, gewechselt. Damit die Aktivität des gesamten aufgefangenen ^{14}C direkt gemessen werden konnte, wurde das CO_2 in 5 ml 2 N NaOH gebunden. Die 5 ml entsprechen der maximalen Lösungsmenge die im Szintillator (LS 1801 Szintillationszähler, Beckmann, München) gemessen werden kann. Um eine ausreichende Adsorption des CO_2 in den 5 ml NaOH zu garantieren, sollte die Strecke, die die Luftblasen in der Lauge zurücklegen mindestens 15 cm betragen (Martens 2007, mdl. Mitt.). Dafür wurden extra schmale Glasröhrchen aus Pasteurpipetten angefertigt.

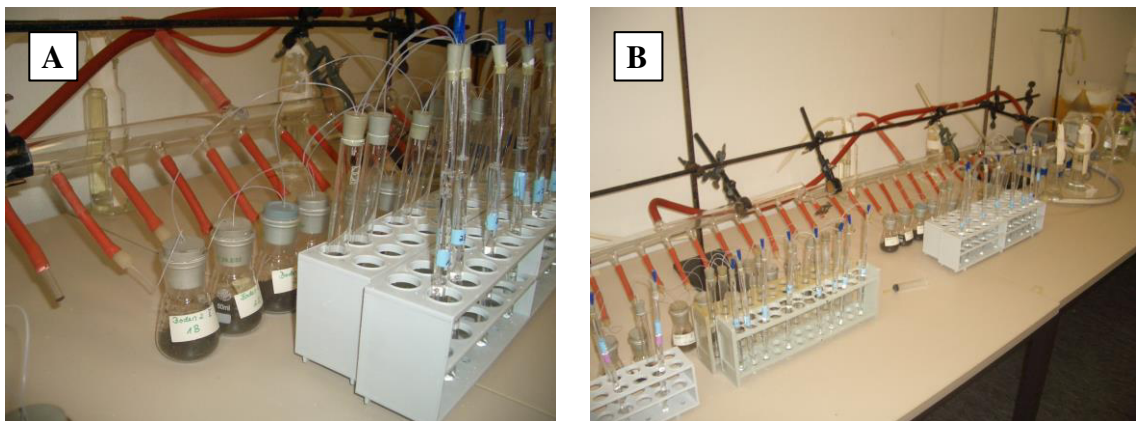


Abbildung 21: Abbildung des Versuchsaufbaus für die Untersuchung des Cry1Ab-Abbaus im Labor
(A - Detailansicht der Bodenreaktoren mit angeschlossenen Überlaufschutz und CO_2 -Falle (2 N NaOH);
B - Übersicht des Gesamtaufbaus)

Die Bodenreaktoren wurden 2-mal wöchentlich gewogen, um eine mögliche Austrocknung rechtzeitig zu erkennen und durch ddH_2O -Zugabe auszugleichen. Während des gesamten Abbauersuchs wurde daher bei keinem Bodenreaktor eine Austrocknung oder Überbefeuchtung festgestellt.

5.2.3 Messung der ^{14}C -Aktivität

Die ^{14}C -Aktivität wurde im Szintillationszähler (LS 1801 Szintillationszähler, Beckmann, München) bestimmt. Wenn nicht anders angegeben wurden im Folgenden immer 2,5 - 5 ml Probe (abhängig von der Aktivität, gemäß Geräteprotokoll) mit 16 ml Szintillationsflüssigkeit (Rotiszint® Eco Plus, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) in einem 20 ml Szintillationsgefäß (Zinsser Analytic GmbH, Frankfurt) gemischt und anschließend gemessen. Für die ^{14}C -Bestimmung in 2N NaOH-Lösung wurde der speziell für basische Proben konzipierte Szintillationscocktail Hionic Fluor (Perkin Elmer, Waltham, USA) benutzt. Proben mit einer Aktivität von weniger als 100 dpm wurden 3 h gemessen, um die Genauigkeit der Messung zu erhöhen. Proben von mehr als 100 dpm wurden 1 h gemessen.

sen. Für alle Proben wurden Vierfachbestimmungen durchgeführt. Die Ergebnisse wurden vom Szintillationsmessgerät in cpm (*counts per minute*) und dpm (*disintegrations per minute*; Berücksichtigung des Quench-Effekts) ausgegeben.

5.2.4 ^{14}C -Bestimmung in verschiedenen Bodenfraktionen

Nach Beendigung des jeweiligen Abbaubersuchs wurde das verbliebene ^{14}C in den in der Folge beschriebenen Bodenfraktionen bestimmt, um daraus Massenbilanzen abzuleiten.

5.2.4.1 ^{14}C -Biomassebestimmung nach der CFI-Methode

Für die Ermittlung des Einbaus von ^{14}C -Atomen aus dem ^{14}C -Cry1Ab in die mikrobielle Biomasse wurde die Biomassebestimmung nach der CFI-Methode (Chloroform-Fumigation-Inkubation, Jenkinson *et al.*, 1976) durchgeführt. Dabei wird die Biomasse indirekt durch die Erfassung der CO_2 -Entwicklung von mikrobiell gebundenem Kohlenstoff bestimmt. Die Bodenproben (je 5 g) aus den Abbaureaktoren wurden zusammen mit 20 ml Chloroform in einem Exsikkator (Duran Produktions GmbH & Co. KG, Mainz) für 12 h begast (Fumigation), um die mikrobielle Biomasse abzutöten. Nach vollständiger Belüftung wurden je 5 g fumigierter Boden und 5 g unbegaste Kontrolle für 10 Tage bei 22°C im Dunkeln in 100 ml Erlenmeyerkolben inkubiert, wie in Abbildung 22 dargestellt. Das durch die Mineralisierung der abgetöteten Biomasse entstehende CO_2 wurde in jeweils 5 ml 2 N NaOH aufgefangen. Um die Austrocknung des Bodens während der Inkubation zu kompensieren wurde er vorher auf 65 % seiner maximalen Wasserhaltekapazität mit ddH₂O angefeuchtet.

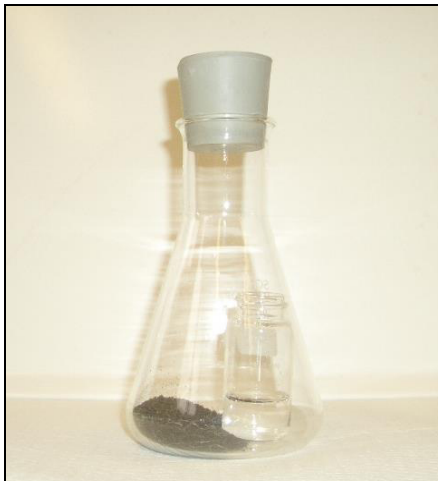


Abbildung 22: Abbildung des Versuchsaufbaus zur Biomassebestimmung nach der CFI-Methode (luftdicht verschlossener 100 ml Erlenmeyerkolben mit 5 g Boden und einem Szintillationsgläschen mit 5 ml 2 N NaOH)

Das aufgefangene $^{14}\text{CO}_2$ wurde direkt im Szintillationszähler gemessen. Aus der Differenz zwischen der $^{14}\text{CO}_2$ Menge der begasten und der unbegasten Probe wurde unter Berück-

sichtigung des von Vance *et al.* (1987) empirisch ermittelten Faktors, der Gehalt an mikrobieller Biomasse des Bodens errechnet.

5.2.4.2 Ermittlung der bioverfügbaren ^{14}C -Fraktion im Boden

Der bioverfügbare Anteil des ^{14}C -Cry1Ab bzw. seiner Abbauprodukte ist in dieser Arbeit als der ^{14}C -Anteil definiert, der sich mit einer wässrigen Lösung aus der Bodenmatrix extrahieren lässt. Um den bioverfügbaren Anteil des im Boden verbliebenen ^{14}C zu ermitteln, wurde dementsprechend ein Teil des Bodens nach Versuchsende extrahiert. Es wurden je 8 g Boden mit 24 ml PBST-Puffer (137 mM NaCl; pH 7,4; 2,7 mM KCl; 10 mM Na_2HPO_4 ; 2 mM KH_2PO_4 ; 0,05 % (v/v) Tween® 20 (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)) für 60 min im Überkopfschüttler bei 4°C im Dunkeln geschüttelt und danach mit 4.000 x g zentrifugiert (Zentrifuge Sigma 6K10, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz). Der Überstand wurde abgenommen und im Szintillationszähler gemessen (siehe Abschnitt 2.3). Zusätzlich wurde mit 200 µl des Überstandes eine Cry1Ab-ELISA Messung (Patho-Screen DAS ELISA-Kit Cry1Ab/Cry1Ac, Agdia, Linaris Biologische Produkte GmbH, Wertheim-Bettingen) in Doppelbestimmung durchgeführt.

5.2.4.3 Verbrennung der Bodenfraktion

Nach Ermittlung der PBST-extrahierbaren ^{14}C -Fraktion sowie des ^{14}C -Anteils in der Biomasse wurde der im Boden verbliebene ^{14}C -Anteil durch Oxidation des Bodens als $^{14}\text{CO}_2$ freigesetzt und gemessen. Dafür wurde der Boden für 24 h bei 105°C getrocknet (Trockenschrank ULM400, Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach) und anschließend für 10 min homogenisiert (elektrischer Achatmörser, Pulverisette 2, AF, Fritsch GmbH, Idar-Oberstein). Die Oxidation erfolgte danach im Verbrennungsgerät (Biological Oxidizer OX 300, R.J Harvey Instrument Corporation, Hillsdale, NJ, USA). Hierbei wurde das bei der Verbrennung freiwerdende ^{14}C in einer speziellen Szintillationslösung (31 % (v/v) Ethanolamin, 21 % (v/v) Methanol, 48 % (v/v) Quickszint 212 (Zinsser GmbH, Frankfurt am Main)) absorbiert und anschließend direkt im Szintillationszähler gemessen (Vierfachbestimmung, vgl. Abschnitt 2.3).

5.2.5 Untersuchung der Bakterienvielfalt in den inkubierten Bodenproben mit der PCR-SSCP-Methode

Die Vielfalt der dominanten Bodenbakterien wurde mit der PCR-SSCP-Methode (Polymerase Kettenreaktion-DNA-Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus-Analyse; Schwieger & Tebbe, 1998) nach dem Abbauersuch in den Böden mit und ohne ^{14}C -Cry1Ab-Zugabe (Kontrollen) untersucht. Dabei wurden die Bakterien auf Grundlage von

Partialsequenzen ihrer 16S rRNA Gene, die mit PCR aus direkt extrahierter Boden-DNA amplifiziert wurden, analysiert. Die Analysen wurden nach der von Dohrmann & Tebbe (2004) beschriebenen Vorgehensweise durchgeführt. Zur Herstellung der SSCP Profile wurden aus den Böden aller Ansätze der Abbauprobversuche sowie sämtlichen zugehörigen Kontrollen die DNA extrahiert und nach PCR die genetischen Profile erstellt. Die mit Flachbett-Gelelektrophorese erstellten und mit Silberfärbung sichtbar gemachten genetischen Fingerprints (SSCP-Profilen) wurden zur Berechnung ihrer Ähnlichkeiten anschließend einer Cluster-Analyse mit dem Programmpaket Gelcompar (Version 4.1; Applied Maths NV, Sint Martens-Latem, Belgien) unterworfen. Die Berechnung erfolgte nach der implementierten Methode von Kropf *et al.* (2004), die die Variabilität einzelner Gruppen miteinander vergleicht. Es wurden für jede Analyse 10.000 Permutationen durchgeführt. Das Signifikanzniveau lag bei $\alpha = 0,05$.

5.3 Ergebnisse

Die Mineralisation des ^{14}C -Cry1Ab wurde in zwei typischen landwirtschaftlich genutzten Böden des Oderbruchs untersucht. Dabei handelte es sich um eine Braunerde – Fahlerde aus schwach tonigem Sand und einen pseudovergleyten Vega-Gley aus sandig tonigem Lehm (vgl. Kapitel 1, Abschnitt 2.1). Im Folgenden wurden für eine bessere Lesbarkeit immer nur die Hauptbodenarten (Sand bzw. Lehm) genannt. In zwei Abbauversuchen wurde den Böden ^{14}C -Cry1Ab mit einer Aktivität von 10.000 dpm zugesetzt. Aufgrund unterschiedlicher spezifischer Aktivitäten der eingesetzten ^{14}C -Cry1Ab-Chargen (siehe Kapitel 2, Abschnitt 4) ergab sich bei Ansatz A eine Cry1Ab-Konzentration im Boden von $14\text{ }\mu\text{g g}^{-1}$ und bei Ansatz B von $50\text{ }\mu\text{g g}^{-1}$. Die Mineralisation wurde durch die Messung der $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzungsraten über einen Zeitraum von 101 (Ansatz A) – 136 (Ansatz B) Tagen ermittelt. Anhand der Wiederfindungsraten des ^{14}C im freigesetzten CO_2 , in der Bodenbiomasse und im Boden wurden ^{14}C -Massenbilanzen aufgestellt. Im Boden wurden zur Erfassung des adsorbierten ^{14}C zusätzlich der extrahierbare und der nicht-extrahierbare ^{14}C -Anteil ermittelt. Außerdem wurden genetische Profile der Bakteriengemeinschaft der Böden mit und ohne ^{14}C -Cry1Ab-Zugabe erstellt, um zu überprüfen ob der Abbau von Cry1Ab zu einer Veränderung der Diversität führte.

5.3.1 Verfolgung des ^{14}C -Cry1Ab-Abbaus im Boden

5.3.1.1 CO_2 -Freisetzung während des Abbaus

In Abbildung 23 sind die prozentualen ^{14}C -Anteile an der zugegebenen Gesamtaktivität (10.000 dpm) im freigesetzten CO_2 als Summenkurven für beide Abbauversuche dargestellt. In den ersten 7 Tagen wurde das $^{14}\text{CO}_2$ in beiden Versuchsansätzen mit zunächst exponentiell steigenden Mengen freigesetzt. Einen Tag nach Versuchsbeginn sind in Ansatz A durchschnittlich 8,0 % des eingesetzten ^{14}C mit einer mittleren Rate von 804 dpm d^{-1} freigesetzt worden und in Ansatz B 17,2 % mit einer Rate von 1720 dpm d^{-1} . Danach verringerten sich die Abbaugeschwindigkeiten exponentiell in beiden Versuchsansätzen und glichen sich nach etwa 14 Tagen einander an (Ansatz A: 35 dpm d^{-1} , Ansatz B: 46 dpm d^{-1}). Nach etwa 30 Tagen erreichte die Freisetzung einen konstanten Wert von durchschnittlich 10 dpm d^{-1} in Ansatz A und 12 dpm d^{-1} in Ansatz B.

Um Massenbilanzen (siehe Kapitel 3, Abschnitt 3.1.2) aufzustellen wurden für jede Anfangskonzentration drei der vier Parallelen nach einer Dauer von 29 Tagen (Ansatz A) und 35 Tagen (Ansatz B) beendet. Die vierte Parallelle jeder Anfangskonzentration wurde jedoch weiter inkubiert bis 136 Tage (A) bzw. 101 Tage (B) nach Zugabe des ^{14}C -Cry1Ab. In

diesem Zeitraum erfolgte die Mineralisation des ^{14}C -Cry1Ab in beiden Versuchsansätzen mit ähnlichen, jedoch leicht abnehmenden Raten.

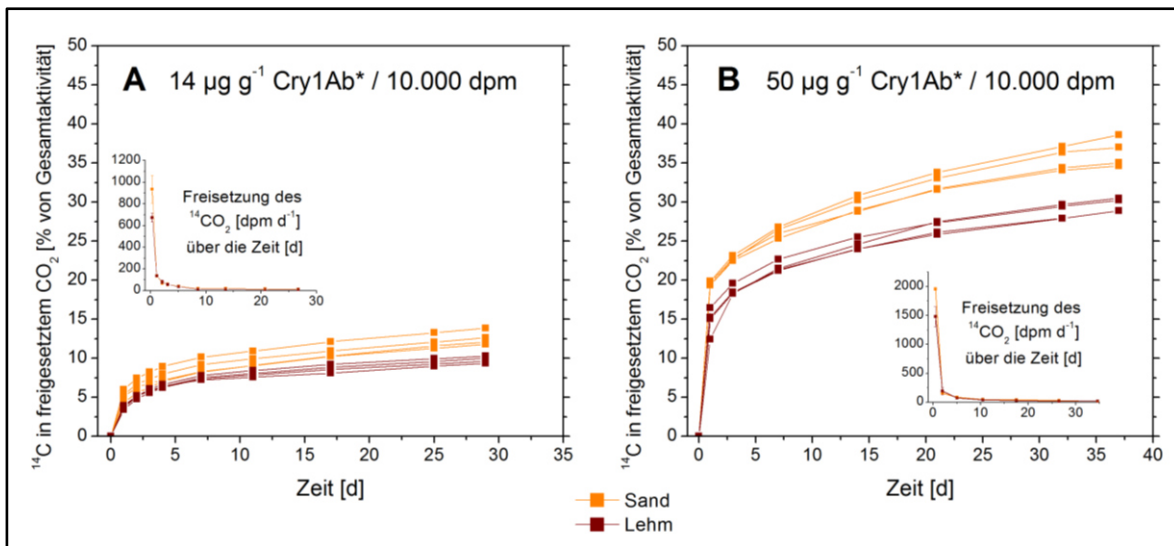


Abbildung 23: Summenkurven des als CO_2 freigesetzten ^{14}C -Anteils der zugegebenen Gesamtaktivität (10.000 dpm) während des Abbaus über eine Dauer von 29 (Ansatz A) bzw. 35 (Ansatz B) Tagen sowie die zugehörige Freisetzung des $^{14}\text{CO}_2$ über die Zeit (je 4 Parallelen pro Boden; *Cry1Ab-Menge bezogen auf das Trockengewicht des Bodens)

Nach 30 Tagen lag der als CO_2 freigesetzte ^{14}C -Anteil von der zugegebenen Gesamtaktivität bei Ansatz A ($14 \mu\text{g g}^{-1}$ Cry1Ab) im Mittel bei 10 % (Lehm) bis 13 % (Sand), was einem Abbau von $1,4 \mu\text{g g}^{-1}$ und $1,8 \mu\text{g g}^{-1}$ ^{14}C -Cry1Ab entsprach. Bei Ansatz B, mit einer etwa 3,5-mal höheren Anfangskonzentration ($50 \mu\text{g g}^{-1}$ Boden), wurde mit durchschnittlich 30 (Lehm) bis 36 % (Sand) dreimal mehr ^{14}C als CO_2 freigesetzt. Bezogen auf die zugegebene Cry1Ab-Menge entsprach dies einem Abbau von $15,0 \mu\text{g g}^{-1}$ und $18,0 \mu\text{g g}^{-1}$ ^{14}C -Cry1Ab.

Unabhängig von der zugegebenen Menge des ^{14}C -Cry1Ab zeigten sich signifikante Unterschiede in der CO_2 -Freisetzung zwischen den Bodenarten (T-Test, Ansatz A: $p = 0,013$; Ansatz B: $p = 0,006$). Bei Ansatz A lag nach einem Monat der CO_2 -Freisetzungsanteil bei Sand um im Mittel 3 % höher als bei Lehm (entspricht einer Differenz von 10 dpm d^{-1}), bei Ansatz B um 7 % (entspricht einer Differenz von 23 dpm d^{-1}).

Nach ca. 60 Tagen lag die $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzung bei beiden Versuchen noch im Mittel bei 10 dpm d^{-1} und blieb bis zum Versuchsende (Ansatz A: 136 Tage, Ansatz B: 101 Tage) konstant (vgl. Anhang 5). Das an den Boden adsorbierte Cry1Ab wurde also kontinuierlich freigesetzt und dem mikrobiellen Stoffwechsel zugeführt.

5.3.1.2 Bilanzierung der Cry1Ab-Anteile in freigesetztem CO₂, Biomasse und Boden

Der ¹⁴C-Cry1Ab-Anteil in der Biomasse des Bodens wurde mit der CFI Methode bestimmt (siehe Kapitel 3, Abschnitt 2.4.1). Danach wurde durch Oxidation des Bodens das verbliebene ¹⁴C ermittelt. Die gemessenen ¹⁴C-Aktivitäten im freigesetzten CO₂, in der Biomasse und im Boden wurden in Massenbilanzen aufsummiert. Anhand der spezifischen Aktivitäten des eingesetzten ¹⁴C-Cry1Ab (Ansatz A - 35.850 dpm mg⁻¹ Cry1Ab, Ansatz B – 10.084 dpm mg⁻¹ Cry1Ab) wurden die absoluten Cry1Ab-Mengen berechnet, auf welche die ¹⁴C-Aktivitäten im freigesetzten CO₂, in der Biomasse und im Boden zurückzuführen waren. Die Ergebnisse sind in Abbildung 24 graphisch dargestellt.

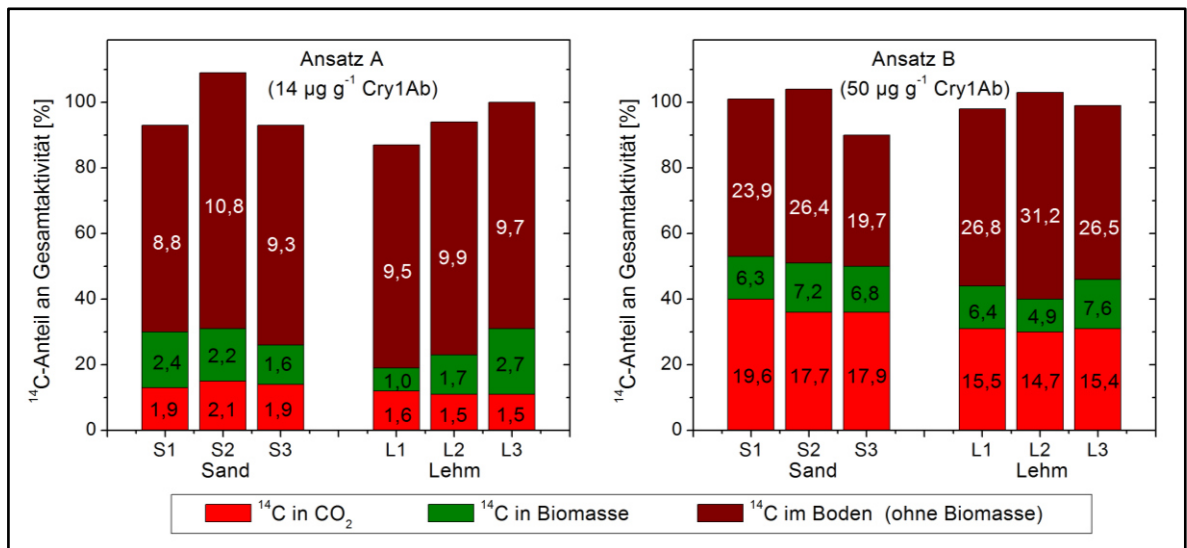


Abbildung 24: Prozentuale ¹⁴C-Anteile an zugegebener Gesamtaktivität (100 % entsprechen 10.000 dpm), gemessen nach einmonatigem Abbau, in CO₂, in der Biomasse und im Boden in Ansatz A und B, dargestellt als Stapelbalkengrafik (Aufsummierung der einzelnen Anteile in einem Balken). Die zugehörigen absoluten Cry1Ab-Konzentrationen im Boden sind als Zahlenwerte in der Maßeinheit µg g⁻¹ (TG) in den einzelnen Balkenabschnitten eingetragen.

Die Wiederfindungsrate des eingesetzten ¹⁴C lag bei der Anfangskonzentration von 14 µg Cry1Ab g⁻¹ Boden zwischen 87 % - 109 % und bei 50 µg Cry1Ab g⁻¹ Boden zwischen 90 % - 103 %. Diese Unterschiede und die Wiederfindungsrate von über 100 % kann auf geringe Abweichungen bei der Aufarbeitung und Messungenauigkeit des Szintillationszählers zurückgeführt werden. Der Messfehler des Szintillationszählers lag bei den hier untersuchten relativ niedrigen Aktivitäten von ca. 100 dpm im Bereich von 3 - 10 %. Unter Berücksichtigung dieser Messungenauigkeit waren die Bilanzen ausgeglichen und damit das gesamte zu Versuchsbeginn eingesetzte ¹⁴C erfasst. Innerhalb der Parallelen wurden

vergleichbare Werte in einem Streuungsbereich von durchschnittlich $\pm 3 \%$ des ^{14}C -Anteils an der Gesamtaktivität gemessen, die Daten erschienen somit konsistent.

Bei der etwa 3,5-fach höheren ^{14}C -Cry1Ab-Anfangskonzentration wurde mehr Cry1Ab in Biomasse und CO_2 umgewandelt. Insgesamt wurde in beiden Bodenarten (Sand und Lehm) etwa 6-mal mehr ^{14}C -Cry1Ab in Biomasse und in CO_2 umgesetzt. Die mittleren Cry1Ab-Mengen betrugen für Sand in Ansatz A $1,95 \mu\text{g g}^{-1}$ im CO_2 , $2,06 \mu\text{g g}^{-1}$ in der Biomasse sowie $9,64 \mu\text{g g}^{-1}$ im Boden und in Ansatz B $18,38 \mu\text{g g}^{-1}$ im CO_2 , $6,80 \mu\text{g g}^{-1}$ in der Biomasse sowie $23,34 \mu\text{g g}^{-1}$ im Boden. Vergleichbare Werte wurden in beiden Ansätzen im Lehm gemessen. Hier ergaben sich in Ansatz A mittlere Cry1Ab-Mengen von $1,54 \mu\text{g g}^{-1}$ im CO_2 , $1,82 \mu\text{g g}^{-1}$ in der Biomasse sowie $9,71 \mu\text{g g}^{-1}$ im Boden und in Ansatz B $15,22 \mu\text{g g}^{-1}$ im CO_2 , $6,28 \mu\text{g g}^{-1}$ in der Biomasse sowie $28,16 \mu\text{g g}^{-1}$ im Boden.

Die, relativ zur zugegebenen Gesamtaktivität, höhere $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzung in Ansatz B ging jedoch nicht mit einem entsprechend höheren prozentualen ^{14}C -Anteil in der Biomasse einher. Unabhängig von den eingesetzten Anfangskonzentrationen wurden in beiden Bodenarten durchschnittlich 14 % des eingesetzten ^{14}C in der Bodenbiomasse wiedergefunden.

Beim Vergleich zwischen den Bodenarten zeigten sich unabhängig von den Anfangskonzentrationen geringfügige Unterschiede. Neben den niedrigeren Messwerten bei den $^{14}\text{CO}_2$ Freisetzungen verblieben im Lehm tendenziell mehr ^{14}C -Cry1Ab im Boden (Differenz von $0,07 \mu\text{g g}^{-1}$ in Ansatz A und $4,82 \mu\text{g g}^{-1}$ in Ansatz B) und es wurde weniger in Biomasse umgesetzt (Differenz von $0,24 \mu\text{g g}^{-1}$ in Ansatz A und $0,52 \mu\text{g g}^{-1}$ in Ansatz B), als im Sand. Die Unterschiede zwischen den Bodenarten traten bei höherer ^{14}C -Cry1Ab-Zugabe deutlicher hervor, waren jedoch bei beiden Anfangskonzentrationen für Biomasse und Boden statistisch nicht signifikant (CO_2 siehe vorheriger Abschnitt 5.3.1.1).

5.3.1.3 Bioverfügbare ^{14}C -Cry1Ab-Anteil im Boden

Durch Extraktion des Bodens mit PBST wurde der bioverfügbare ^{14}C -Cry1Ab-Anteil ermittelt (siehe Kapitel 3, Abschnitt 2.4.2). Zusätzlich wurden die ^{14}C -Anteile mit Hilfe der spezifischen Aktivität des zugegebenen ^{14}C -Cry1Ab auf die zugrundeliegende Cry1Ab-Menge im Boden umgerechnet. Die Ergebnisse der ^{14}C -Bestimmung in den Extrakten sowie die zugehörigen ^{14}C -Cry1Ab-Mengen sind in Abbildung 25 und Tabelle 18 dargestellt.

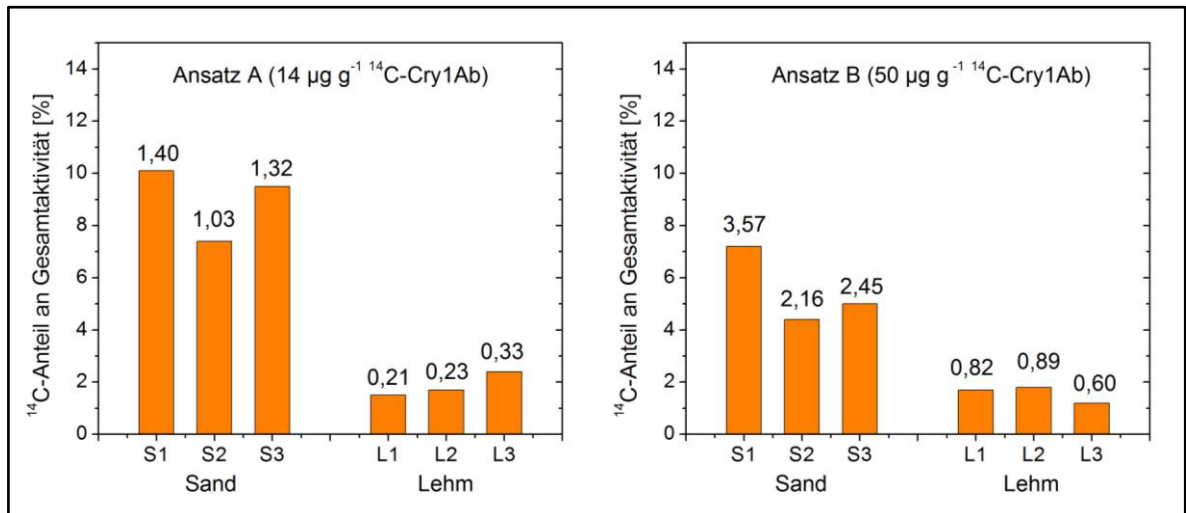


Abbildung 25: Aus dem Boden extrahiertes ${}^{14}\text{C}$ nach einmonatigem Abbau, angegeben als prozentualer Anteil an der zugebenen Gesamtaktivität für Ansatz A und B. Die zugehörigen absoluten Cry1Ab-Konzentrationen im Boden sind als Zahlenwerte in der Maßeinheit $\mu\text{g g}^{-1}$ (TG) über den einzelnen Balken eingetragen.

Unabhängig von den ${}^{14}\text{C-Cry1Ab}$ -Anfangskonzentrationen wurde erwartungsgemäß, aufgrund der stärkeren Adsorption, aus Lehm deutlich weniger ${}^{14}\text{C}$ extrahiert, als aus Sand. In Ansatz A wurde im Extrakt aus Lehm etwa 5-mal weniger ${}^{14}\text{C}$ quantifiziert und in Ansatz B 2-mal weniger. Die entsprechenden ${}^{14}\text{C-Cry1Ab}$ -Mengen betrugen in Ansatz A im Mittel $1,25 \mu\text{g g}^{-1}$ im Sand und $0,26 \mu\text{g g}^{-1}$ im Lehm und in Ansatz B durchschnittlich $2,73 \mu\text{g g}^{-1}$ im Sand und $0,77 \mu\text{g g}^{-1}$ im Lehm. Die beobachteten Unterschiede zwischen den Bodenarten waren beim statistischen Vergleich der Mittelwerte (ANOVA) für beide ${}^{14}\text{C-Cry1Ab}$ -Anfangskonzentrationen signifikant.

Beim Vergleich der aus der jeweiligen Bodenart extrahierten ${}^{14}\text{C}$ -Menge zwischen den ${}^{14}\text{C-Cry1Ab}$ -Anfangskonzentration zeigte sich bei niedrigerer ${}^{14}\text{C-Cry1Ab}$ Zugabe ein signifikant höherer ${}^{14}\text{C}$ -Anteil an der zugegebenen Gesamtaktivität von durchschnittlich 3 % im Sand (siehe Abbildung 25). Die entsprechenden ${}^{14}\text{C}$ -Anteile im Lehm wiesen zwischen den Anfangskonzentrationen keinen Unterschied auf. Bei Betrachtung der zugrundeliegenden ${}^{14}\text{C-Cry1Ab}$ -Mengen wurde im Extrakt aus Ansatz B im Sand durchschnittlich 2,2 mal mehr und im Lehm 3,0 mal mehr ${}^{14}\text{C}$ als in Ansatz A gemessen. Die Faktoren lagen jedoch niedriger als die Differenz zwischen den Anfangskonzentrationen mit dem Faktor von 3,5. Diese Unterschiede waren vermutlich auf die konzentrationsabhängige Adsorption des ${}^{14}\text{C-Cry1Ab}$ an die Bodenbestandteile zurückzuführen.

Tabelle 18: ^{14}C -Massenbilanzen für Ansatz A und B über adsorbiertes ^{14}C im Boden, bioverfügbare ^{14}C -Fraktion als PBST-Extrakt sowie als CO_2 freigesetztes ^{14}C , angegeben als prozentuale Anteile an zugegebener Gesamtaktivität. (S1, S2, S3 – Parallelen der Versuchsansätze mit Sand in Ansatz A und B; L1, L2, L3 – Parallelen der Versuchsansätze mit Lehm in Ansatz A und B)

	Probe	^{14}C in CO_2 [%]	^{14}C im Extrakt [%]	adsorbiertes ^{14}C im Boden [%]	Wiederfindung [%]
Ansatz A	S1	13,25	10,05	71,27	94,57
	S2	15,30	7,35	72,04	94,69
	S3	13,51	9,45	76,27	99,23
	L1	11,59	1,50	83,52	96,61
	L2	10,66	1,65	81,05	93,36
	L3	10,91	2,40	82,48	95,79
Ansatz B	S1	39,56	7,20	43,47	90,23
	S2	35,62	4,35	53,73	93,70
	S3	36,00	4,95	55,56	96,51
	L1	31,30	1,65	75,05	108,00
	L2	29,72	1,80	66,10	97,62
	L3	31,06	1,20	62,29	94,55

Bei der Bilanzierung des wiedergefundenen ^{14}C über den ^{14}C -Anteil im CO_2 , den bioverfügbaren Anteil im Boden sowie den im Boden adsorbierten Anteil ergaben sich in beiden Ansätzen Wiederfindungsraten von 90 bis 108 %. Unter Berücksichtigung der Messungenauigkeiten waren die Bilanzen somit ausgeglichen und das gesamte ^{14}C erfasst.

5.3.2 Quantifizierung des Cry1Ab mit ELISA

Das mit PBST extrahierte ^{14}C wurde zusätzlich mit ELISA quantifiziert, um den Anteil des noch immunaktiven Toxins zu ermitteln, da die ^{14}C -Messung allein keinen Rückschluss über den möglichen Degradationsgrad des ^{14}C -Cry1Ab zulässt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 26 dargestellt.

Es zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den Bodenarten. In Ansatz A wurde im PBST-Extrakt des Sandes durchschnittlich $0,8 \text{ ng g}^{-1}$ nachgewiesen. Es wurde kein Cry1Ab im Lehm mit ELISA detektiert. Bei Ansatz B zeigten die Messergebnisse ein ähnliches Bild. Im Sand wurde eine Cry1Ab-Menge von durchschnittlich $5,2 \text{ ng g}^{-1}$ nachgewiesen, im

Lehm wurden nur Spuren ($< 0,01 \text{ ng g}^{-1}$) von Cry1Ab gemessen. Damit befand sich nach einmonatigem Abbau, bedingt durch die höhere Cry1Ab-Zugabe zu Beginn, im Sand von Ansatz B noch etwa 6-mal mehr immunaktives Cry1Ab wie bei Ansatz A.

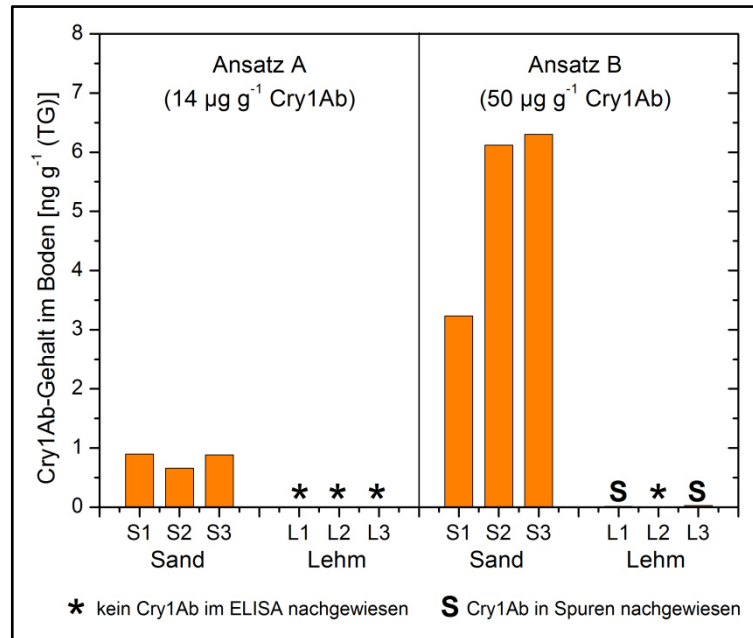


Abbildung 26: ELISA-Quantifizierung des Cry1Ab im PBST-Extrakt

Die mit ELISA maximal nachgewiesene Menge immunaktiven Cry1Abs in Ansatz A entsprach 0,11 % des extrahierten ^{14}C -Anteils und in Ansatz B 0,17 % und lag damit in der gleichen Größenordnung. Demnach waren über 99% des extrahierbaren ^{14}C -Cry1Ab-Anteils nach einer Inkubationsdauer von einem Monat bereits soweit abgebaut, dass sie nicht mehr als immunaktives Protein detektierbar waren.

Die Abhängigkeit der nachweisbaren Menge des immunaktiven Cry1Ab vom Tonanteil zeigte sich auch in den Messergebnissen des Freilandmonitorings dieser Arbeit (vgl. Kapitel 1, Abschnitt 3.5 und 3.6).

5.3.3 Untersuchung des genetischen Profils der Bodenmikroorganismen

Die Messungen der ^{14}C -Aktivität im freigesetzten CO_2 und der Bodenbiomasse zeigten, dass das ^{14}C -Cry1Ab in Sand und Lehm bei hoher (50 $\mu\text{g g}^{-1}$) und niedriger (14 $\mu\text{g g}^{-1}$) ^{14}C -Cry1Ab-Anfangskonzentration mikrobiell abgebaut wurde. Um zu überprüfen ob der mikrobielle Abbau oder andere Effekte des Cry1Ab zu Verschiebungen in der Zusammen-

setzung der Bakteriengemeinschaften führten und um die entsprechenden abbauenden Bakterien direkt sichtbar zu machen, wurde nach einmonatiger Inkubationszeit die Vielfalt der dominanten Vertreter durch genetisches Fingerprinting von PCR amplifizierten 16S rRNA Genen mit Hilfe der SSCP Technik in beiden Ansätzen untersucht und einer Ähnlichkeitsanalyse unterzogen (siehe Kapitel 3, Abschnitt 2.5). Die Ergebnisse sind in den Abbildung 27 und Abbildung 28 dargestellt.

Die Cluster-Analyse der SSCP-Profile der Böden aus Ansatz A mit geringer ^{14}C -Cry1Ab-Zugabe ($14 \mu\text{g g}^{-1}$) zeigte weder bei Lehm noch bei Sand signifikante Unterschiede zwischen den Ansätzen mit Cry1Ab und den Kontrollen (Signifikanztest nach Kropf *et al.* (2004) $p = 0,6$ (Sand); $p = 0,457$ (Lehm)). Die zugegebene Cry1Ab-Menge hatte offensichtlich keine Änderung der Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft durch Stimulierung oder Hemmung einzelner Vertreter zur Folge.

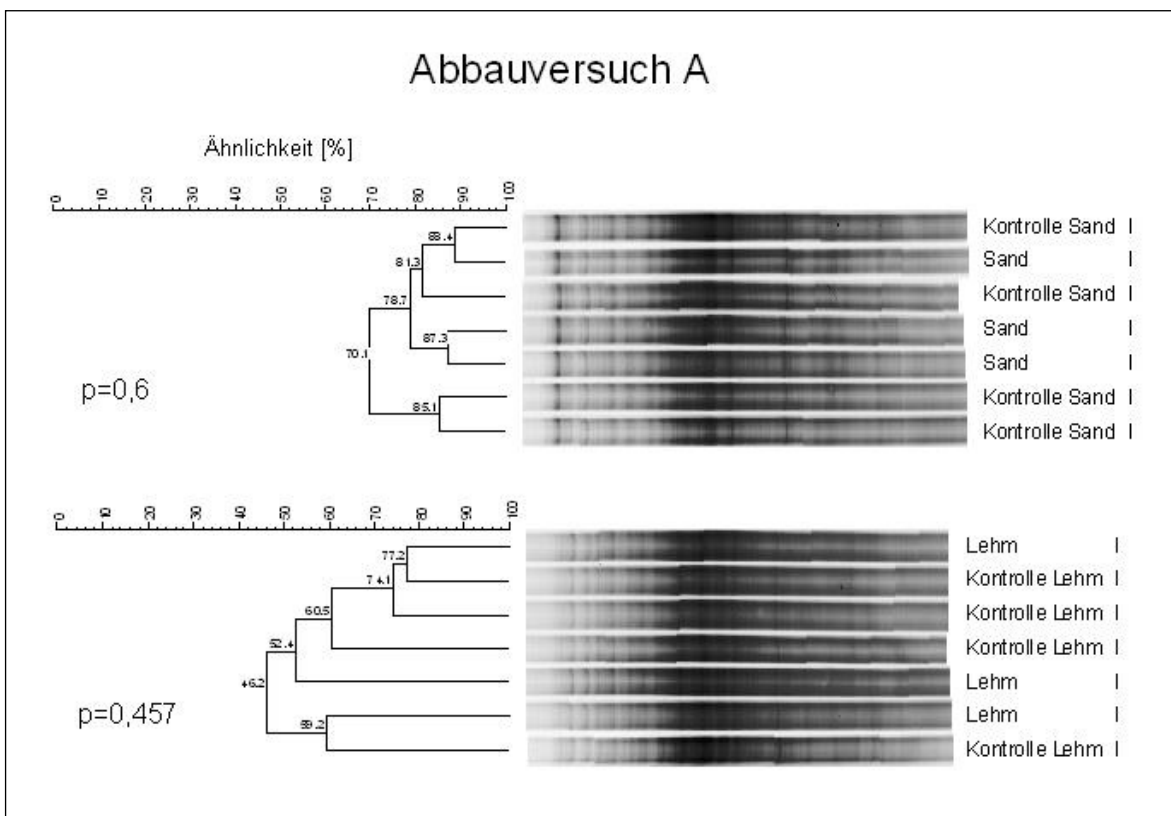


Abbildung 27: Cluster-Analyse der SSCP-Profile der Böden von Ansatz A (berechnet mit Hilfe des Programmpakets GelCompar (vgl. Kapitel 3, Abschnitt 5.2.5))

Bei hoher ^{14}C -Cry1Ab-Zugabe von $50 \mu\text{g g}^{-1}$ (Ansatz B) wurde ein signifikanter Unterschied der genetischen Profile zwischen den Kontrollen und dem Cry1Ab-haltigen Boden im Sand ($p = 0,028$), jedoch nicht im Lehm ($p = 0,256$) ermittelt. Die Signifikanz zeigte sich bei dem

Böden mit der höchsten Mineralisierungsrate (Sand in Ansatz B, siehe Kapitel 3, Abschnitt 5.3.1.1). Die ^{14}C -Cry1Ab-Umsetzung führte hier demnach wahrscheinlich zu einer Verschiebung der dominanten Bakterienarten.

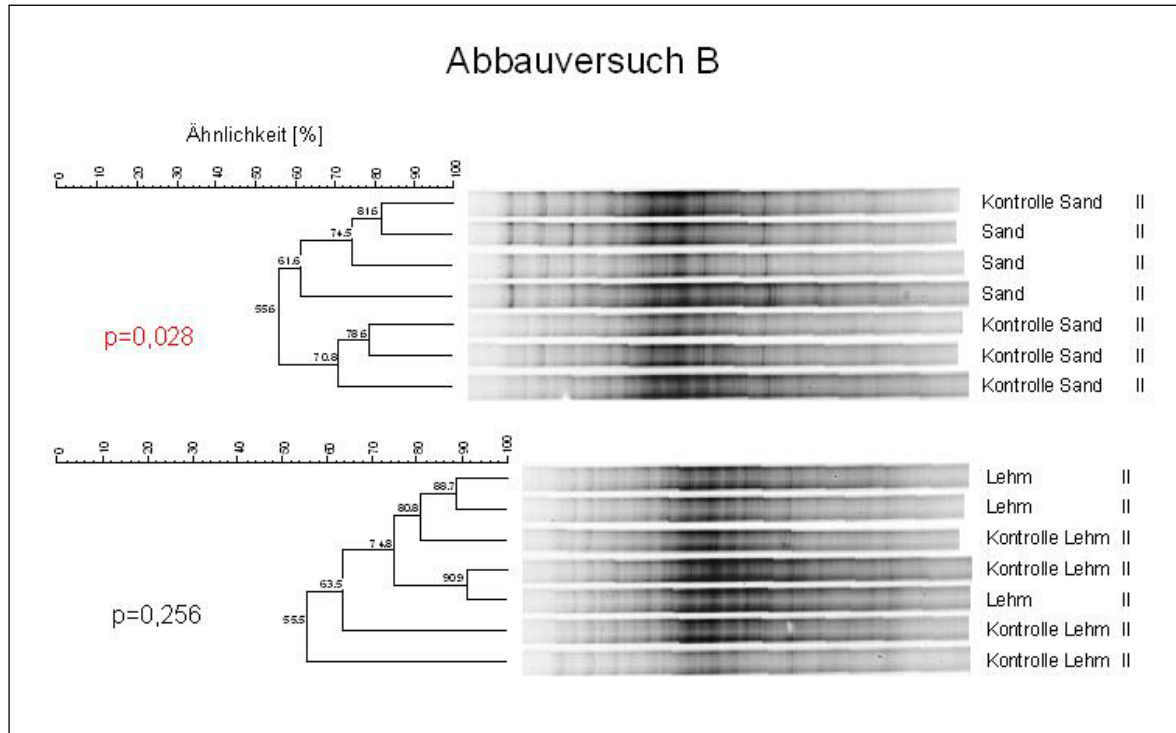


Abbildung 28: Cluster-Analyse der SSCP-Profile der Böden von Ansatz B (berechnet mit Hilfe des Programmpakets GelCompar (vgl. Kapitel 3, Abschnitt 5.2.5))

Durch die höhere Adsorption des Cry1Ab an den Lehmboden kam hier es trotz hoher ^{14}C -Cry1Ab-Zugabe, wie auch an der niedrigeren Mineralisierungsrate erkennbar war, nicht zu so einem starken Abbau des Cry1Ab wie im Sand und damit offensichtlich auch zu keiner sichtbaren Änderung in der Zusammensetzung der Bodenmikroorganismengemeinschaft.

5.4 Diskussion

Im Allgemeinen gelten Proteine als leicht abbaubar, da sie von vielen Mikroorganismen als Energie-, Kohlenstoff- und Stickstoffquelle genutzt werden. Im Boden erfolgt der Proteinabbau durch von Mikroorganismen freigesetzte Proteasen (Quiquampoix, 2000). Die Proteasen zerlegen die Proteine in ihre Bausteine, die Aminosäuren oder zu kurzkettigen Oligopeptiden, die dann von den Mikroorganismen aufgenommen werden können. Aus biochemischer Sicht gibt es keinen erkennbaren Grund, warum sich das Cry1Ab Protein anders verhalten sollte als vergleichbare Proteine. Im Boden besteht die Möglichkeit, dass der mikrobielle Abbau durch Adsorption der Proteine, ihrer Zwischenprodukte (Oligopeptide) und ihrer Bausteine an die Bodenbestandteile erschwert wird. Die Fähigkeit zur Adsorption von Aminosäuren und Cry1Ab an Bodenbestandteile wurde bereits nachgewiesen (Tapp & Stotzky, 1995; Vieublé Gonod *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008). Auch zum Abbau von Cry1Ab im Boden liegen außerdem einige Untersuchungen vor (Douville *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2007; Marchetti *et al.*, 2007). Hierbei wurde reines Cry1Ab in Konzentrationen zwischen 10 - 1000 ng g⁻¹ dem Boden zugegeben und die Entwicklung des Cry1Ab-Gehaltes im Boden mit ELISA-Messungen über die Zeit verfolgt. In allen Fällen wurde eine deutliche Abnahme des Cry1Ab-Gehaltes festgestellt (bis 90 % nach 30 Tagen bei Wang *et al.* (2007) und Marchetti *et al.* (2007)) und ein mikrobieller Abbau des Cry1Ab vermutet. Aufgrund der Messmethoden konnte jedoch dabei eine stattfindende Adsorption des Cry1Ab an den Boden nicht ausgeschlossen werden.

5.4.1 Abbau des Cry1Ab im Boden

In dieser Arbeit war es mit Hilfe der ¹⁴C-Markierung von Cry1Ab möglich, erstmals die Metabolisierung des Proteins in Böden als Freisetzung von ¹⁴CO₂ sichtbar zu machen und anhand von Massenbilanzen den Verbleib des ¹⁴C-Cry1Ab zu ermitteln. Es wurde der Abbau des ¹⁴C-Cry1Ab in Lehm (Lts, siehe Kapitel 1, Abschnitt 3.4) und Sand (St2, siehe Kapitel 1, Abschnitt 3.4) mit Anfangskonzentrationen von 14 µg g⁻¹ und 50 µg g⁻¹ untersucht. Die eingesetzten Cry1Ab-Anfangskonzentration resultierten aus den spezifischen Aktivitäten des ¹⁴C-markierten Cry1Ab (vgl. Kapitel 2, Abschnitt 3.2.1) und entsprachen mit 14 µg g⁻¹ etwa der 90-fachen und mit 50 µg g⁻¹ der 300-fachen bei landwirtschaftlichem Anbau von MON810-BT-Mais im Freiland maximal zu erwartenden Eintragsmenge (1,3 kg ha⁻¹; vgl. Kapitel 1) in den Boden, basierend auf einer mittleren Bodendichte von 1,3 bis 1,5 g cm⁻³ in Sandboden und Lehmboden (Scheffer/Schachtschabel, 1998). Die Ergebnisse zeigten, dass der mikrobielle Abbau des Cry1Ab direkt nach der Zugabe begann und zu einer exponentiellen Zunahme führte, die, unabhängig von der Anfangskonzentration, nach etwa 16 Tagen in einen langsameren, aber kontinuierlich weiter-

laufenden Abbau übergang. Innerhalb von 30 Tagen wurden, abhängig von der Cry1Ab-Anfangskonzentration und der Bodenart, 30 - 50 % des zugegebenen ^{14}C -Cry1Ab in CO_2 und Biomasse umgesetzt. Im Vergleich zu den Ergebnissen von Wang *et al.* (2007) und Marchetti *et al.* (2007) wären demnach 40 - 60 % weniger Cry1Ab abgebaut worden. Die Messmethode der genannten Untersuchungen beruhte jedoch auf Extraktion und direkter ELISA-Messung des Cry1Ab. Parallel zur Quantifizierung des in die Biomasse eingebauten ^{14}C -Cry1Ab wurde in der vorliegenden Arbeit auch eine Extraktion der Böden durchgeführt. Nach 30 Tagen wurden in dieser Arbeit noch maximal 10 % (Sand, Ansatz A) des zugegebenen ^{14}C aus dem Boden extrahiert. Das stimmte mit den Ergebnisse von Wang *et al.* (2007) und Marchetti *et al.* (2007) überein, welche nach 30 Tagen aufgrund der Extraktionsergebnisse einen Cry1Ab-Abbau von 90 % vermuteten. Mit Hilfe der ^{14}C -Massenbilanz wurde jedoch nun ersichtlich, dass sich im Boden noch bis zu 50 - 70 % des eingesetzten ^{14}C befanden. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Abbaurate von Cry1Ab im Boden in Messungen, welche ausschließlich auf Extraktion beruhten, bisher möglicherweise überschätzt wurde.

Von Accinelli *et al.* (2008) wurde der Abbau von ^{14}C -markiertem Cry1Ac in landwirtschaftlich genutztem Boden (lehmigem Sand) untersucht. Das ^{14}C -Cry1Ac wurde ebenso wie das ^{14}C -Cry1Ab in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe eines gentechnisch veränderten *Escherichia coli* Bakterienstammes hergestellt. Da Cry1Ab und Cry1Ac eine Sequenzhomologie von 88 % aufweisen, besitzen sie vermutlich ein sehr ähnliches Adsorptionsverhalten (Madliger *et al.*, 2010) und eignen sich daher gut für einen Vergleich. Es wurde ^{14}C -Cry1Ac Proteinlösung mit einer Aktivität von $2,2 \cdot 10^{-1} \text{ MBq ml}^{-1}$ dem Boden zugegeben, so dass eine Konzentration von $10 \mu\text{g g}^{-1}$ Cry1Ac im Boden erreicht wurde. Jedoch wurden keine Angaben zur absoluten Aktivität des ^{14}C im Boden gemacht. Die Inkubation erfolgte über 20 Tage bei 25°C im Dunkeln. Zur Auswertung wurden Massenbilanzen über die ^{14}C -Anteile im freigesetzten CO_2 und den im Boden verbliebenen Anteil aufgestellt. Eine Ermittlung des Biomasseanteils sowie des extrahierbaren Anteils, wie in der vorliegenden Arbeit, wurde jedoch nicht durchgeführt. Die untersuchten Parameter ließen deshalb keinen Rückschluss auf den möglicherweise sorbierten Anteil des ^{14}C -Cry1Ac zu. Vergleichbare Untersuchungsparameter wurden in Ansatz A dieser Arbeit verwendet ($14 \mu\text{g g}^{-1}$ ^{14}C -Cry1Ab in Sand, inkubiert bei 20°C über 30 Tage im Dunkeln). Im Vergleich zur $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzung beim Abbau des ^{14}C -Cry1Ab in der vorliegenden Arbeit, ermittelten Accinelli *et al.* (2008) nach 20 Tagen eine etwa fünfmal höhere Mineralisation des zugegebenen ^{14}C -Cry1Ac von 59 - 63 %. Dieser Unterschied deutet auf einen generell schnelleren Abbau von Cry1Ac im Vergleich zum Cry1Ab hin, möglicherweise durch eine niedrigere Adsorption an die Bodenbestandteile. Abweichungen können aber auch da-

durch beeinflusst sein, dass sich die ^{14}C -markierten Proteine in ihrer Reinheit unterschieden (Accinelli *et al.* machen hierzu keine Angaben), die Anfangskonzentrationen sowie Inkubationsbedingungen etwas unterschiedlich waren und andere Böden für die Abbauuntersuchungen verwendet wurden. Generell beweisen aber sowohl die Arbeit von Accinelli *et al.* (2008) als auch die eigenen Untersuchungen, dass Cry1A Proteine (Cry1Ac, bzw. Cry1Ab) im Boden durch mikrobielle Aktivität abgebaut wurden. Der in dieser Arbeit gezeigte Einbau von ^{14}C in die mikrobielle Biomasse beweist darüber hinaus, dass die Aminosäuren als C-Quelle zum Wachstum verwertet wurden.

5.4.2 Adsorption des Cry1Ab im Boden

In allen Abbauversuchen wurde ein Teil des zugegebenen ^{14}C -Cry1Ab offensichtlich sofort nach der Zugabe vom Boden adsorbiert, ein anderer Teil verblieb jedoch in der Bodenlösung und stand direkt für den mikrobiellen Abbau zur Verfügung, wie die nicht extrahierbaren ^{14}C -Anteile im Boden (siehe Kapitel 3, Abschnitt 3.1.2) sowie die ^{14}C -Freisetzungskurven belegten (siehe Kapitel 3, Abschnitt 2.4.1). In früheren Adsorptionsstudien zu Cry-Proteinen an ausgewählte Tonminerale (z.B. Kaolinit, Montmorillonit) wurde bereits gezeigt, dass bei zugegebenem reinen Cry1Ab innerhalb von 30 Minuten das Adsorptionsplateau erreicht wird und sich zwischen dem Cry1Ab in der flüssigen Phase und dem adsorbierten Cry1Ab ein Gleichgewicht herausbildet (Venkateswerlu & Stotzky, 1992; Tapp *et al.*, 1994; Tapp & Stotzky, 1995). Den gleichen Zeitraum ermittelten Pagel-Wieder *et al.* (2004) für die Adsorption von Cry1Ab an Tonminerale aus Freilandböden. Die dort veröffentlichten Daten zeigten deutlich, dass die absolute sorbierte Cry1Ab-Menge mit steigender Cry1Ab-Anfangskonzentration wuchs. Mit steigender Cry1Ab-Konzentration nahm die relative Sorption jedoch ab, was sich durch eine Absättigung der spezifischen Oberflächen erklärte. Dieser Effekt spiegelte sich in der vorliegenden Arbeit beim Vergleich des im Boden verbliebenen ^{14}C -Cry1Ab-Anteils zwischen hoher und niedriger ^{14}C -Cry1Ab-Anfangskonzentration wieder (siehe Kapitel 3, Abschnitt 3.1.2). Es fiel auf, dass, gemessen an der eingesetzten ^{14}C -Cry1Ab-Gesamtmenge, bei niedriger Anfangskonzentration in beiden Bodenarten durchschnittlich 20 % mehr ^{14}C -Cry1Ab im Boden verblieb, als bei hoher Anfangskonzentration. Gleichzeitig war bei hoher Anfangskonzentration ($50\text{ }\mu\text{g g}^{-1}$) die anfängliche Abbaurate (1720 dpm d^{-1}) doppelt so hoch wie bei niedriger Anfangskonzentration ($14\text{ }\mu\text{g g}^{-1}$; 804 dpm d^{-1}). Nach etwa 16 Tagen war der höhere Cry1Ab-Anteil abgebaut und die Abbauraten der beiden Ansätze glichen sich einander an (A - 35 dpm d^{-1} , B - 46 dpm d^{-1}). Vermutlich erfolgte bei der höheren eingesetzten Cry1Ab-Menge bereits die Absättigung, so dass hier in der Relation zur Gesamtproteinmenge weniger Protein adsorbiert wurde.

Unabhängig von der zugesetzten Cry1Ab-Menge zeigten die beiden Bodenarten (Sand und Lehm) die gleichen Effekte: Im Sand wurde durchschnittlich 5 % mehr ^{14}C freigesetzt als im Lehm. Die untersuchten Böden unterschieden sich hauptsächlich im Ton- und Sandgehalt, sowie den mit der Korngröße korrelierten Parametern wie Kationenaustauschkapazität, maximale Wasserhaltekapazität und Kohlenstoffgehalt. Der Schluffanteil und der Boden-pH-Wert wiesen in beiden Bodenarten vergleichbare Werte auf und konnten somit als Parameter für die beobachteten Unterschiede vernachlässigt werden. Der Hauptgrund für die höhere ^{14}C -Freisetzung im Sand lag vermutlich in der stärkeren Adsorption des Proteins an die Tonfraktion, die im Lehm um 30 Gew.-% größer war (siehe Kapitel 3, Tabelle 16).

Es wurde bereits gezeigt, dass die Adsorption von Cry1Ab an Tonminerale bei pH-Werten zwischen 5 - 6 am stärksten ist (Madliger *et al.*, 2011; Pagel-Wieder *et al.*, 2007). Die in dieser Arbeit untersuchten Böden wiesen mit pH-Werten von pH 5,0 - 5,2 somit optimale Bedingungen für die Adsorption von Cry1Ab auf. Im Gegensatz zu den Vermutungen aus früheren Adsorptionsstudien, dass sich Cry1Ab irreversibel und dauerhaft an die Bodenbestandteile adsorbiert (Venkateswerlu & Stotzky, 1992; Tapp *et al.*, 1994; Tapp & Stotzky, 1995; Crecchio & Stotzky, 1998; Pagel-Wieder *et al.*, 2004), wurde hier unabhängig von der ^{14}C -Cry1Ab-Anfangskonzentration in beiden Bodenarten ein kontinuierlich fortlaufender ^{14}C -Cry1Ab-Abbau, anhand der ^{14}C -Freisetzung der über 100 Tage weitergeführten Ansätze (siehe Anhang 5), festgestellt. Das adsorbierte Cry1Ab wurde somit nach und nach wieder freigesetzt und dann unmittelbar mikrobiell abgebaut. Der mikrobielle Abbau wurde zusätzlich durch die Quantifizierung des Cry1Ab mit ELISA in den Extrakten belegt (siehe Kapitel 3, Abschnitt 3.1.3). Von dem extrahierten ^{14}C wurden nur 0,11 - 0,17 % als immunaktives ^{14}C -Cry1Ab identifiziert. Die Möglichkeit der Desorption des Cry1Ab wurde in mehreren Adsorptionsstudien für ausgewählte Tonminerale und Huminstoffe bereits nachgewiesen (Wang *et al.*, 2008; Fu *et al.*, 2009; Sander *et al.*, 2010; Madliger *et al.*, 2011; Tomaszewski *et al.*, 2011). Bei Sander *et al.* (2010) wurde der Adsorptionsmechanismus mit Hilfe von Quarzkristall-Mikrowagen in Kombination mit *optical waveguide lightmode spectroscopy* untersucht. Es zeigte sich, dass die Adsorption von Cry1Ab durch elektrostatische Interaktionen bestimmt wird, reversibel ist und Cry1Ab eine hohe strukturelle Stabilität aufweist. Anhand der Untersuchungsergebnisse wurde für das Verhalten von Cry1Ab im Boden vermutet, dass Cry1Ab mit sinkender Proteinkonzentration in der Bodenlösung mobilisiert wird, was mit den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit bestätigt wurde. Zu ähnlichen Schlussfolgerungen kamen auch Studien zum Verhalten von Aminosäuren im Boden. Auch hier wurde ein Teil der zugegebenen Aminosäuren (Lysine, Leucine) sofort adsorbiert, während der andere Teil

direkt mikrobiell abgebaut wurde (Vinolas *et al.*, 2001; Vieublé Gonod *et al.*, 2006). Trotz der Adsorption wurde ebenfalls keine Akkumulation festgestellt (Stevenson, 1982). Deshalb gingen Vieublé Gonod *et al.* (2006) davon aus, dass auch die adsorbierten Anteile nicht vollständig vor mikrobiellem Abbau geschützt waren. Unterstützt wurde diese Annahme von der Erkenntnis, dass Mikroorganismen sich bevorzugt nah an geladenen Oberflächen aufhalten (Van Loosdrecht *et al.*, 1990) und somit vermutlich in engem räumlichen Kontakt mit den adsorbierten Aminosäuren standen. Diese Mechanismen galten vermutlich auch für die adsorbierten Cry1Ab-Proteine, wie der in der vorliegenden Arbeit beobachtete kontinuierlich weiterlaufende mikrobielle Abbau belegte.

5.4.3 Auswirkung des Cry1Ab-Abbaus auf die Bodenmikroorganismengemeinschaft

Genetische Fingerprint-Techniken von direkt aus dem Boden mit PCR amplifizierter rRNA bieten die Möglichkeit, die strukturelle Vielfalt der Bakterien einer Bodenprobe sichtbar zu machen. Hier sollte geklärt werden, ob das Cry1Ab zu Veränderungen in der Bakterienvielfalt führte. Das Wachstum eines Organismus ließe dabei darauf schließen, dass das Cry1Ab verwertet werden würde. Dieser Effekt würde umso deutlicher hervortreten, je höher die eingesetzte Cry1Ab-Menge wäre. Eine Wirkung des Cry1Ab auf einen Organismus, könnte sich dagegen schon bei niedrigen Cry1Ab-Konzentrationen durch Abnahme der betroffenen Bakterienpopulationen zeigen. In diesen Untersuchungen wurde die SSCP-Technik eingesetzt, die sich für derartige Untersuchungen neben der TRFLP (*Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*) und DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) Technik im vergangenen Jahrzehnt bereits bewährt hat (Orita *et al.*, 1989; Schwieger & Tebbe, 1998; Dohrmann & Tebbe, 2004). Bei dem Vergleich der Profile aus dem Ansatz mit der höheren Anfangskonzentration zeigte sich, dass es im sandigen Boden vermutlich zu einer signifikanten Veränderung der Bodenmikroorganismengemeinschaft kam (siehe Kapitel 3, Abschnitt 3.3). Im Lehm Boden des gleichen Versuchs wurde kein Effekt des Cry1Ab nachgewiesen. Dies könnte mit der höheren Adsorption des Cry1Ab und der damit einhergehenden geringeren Konzentration des Cry1Ab in der Bodenlösung korrelieren. Zudem ist bereits bekannt, dass die Tonminerale die Aktivität der Bodenmikroorganismen hemmen, indem sie physikalisch die Diffusion von Sauerstoff und Substraten in die Zelle oder die Diffusion von Abfallprodukten aus der Zelle behindern (Gordon & Millero, 1985; Magdaliniuk *et al.*, 1995; Quiquampoix, 2000; Griffith & Fletcher, 1991; Calamai *et al.*, 2000). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen, dass eine mögliche Verschiebung in der Zusammensetzung der Bodenmikroorganismengemeinschaft durch Wachstum hervorgerufen wurde, da nur bei der höchsten Cry1Ab-Konzentration ein Effekt sichtbar war. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass der

signifikanter Unterschied auf einer räumlichen Variabilität in der Bakterienvielfalt des Bodens beruht. Um eine sichere Aussage darüber abzuleiten müssen weitere Untersuchungen zur Zusammensetzung der Bodenmikroorganismengemeinschaft in Abhängigkeit von der Cry1Ab-Konzentration im Boden durchgeführt werden.

Ebenfalls einen Effekt auf die Zusammensetzung der Bodenmikroorganismengemeinschaft ermittelte Castaldini *et al.* (2005) in Cluster-Analysen von DGGE-Profilen von Bodenmikroorganismengemeinschaften aus freiem Boden sowie Rhizosphärenboden aus Mikrokosmen-Versuchen zum Abbau von Cry1Ab-haltigem Pflanzenmaterial. Es wurden jedoch keine Angaben zu den erreichten Cry1Ab-Konzentrationen im Boden gemacht. Der Nachteil bei solchen Untersuchungen, die nicht mit reinem Cry1Ab arbeiten, sondern mit Cry1Ab-haltigem Pflanzenmaterial ist jedoch, dass die Auswirkungen des Abbaus des Pflanzenmaterials auf die Bodenmikroorganismen nicht von denen des reinen Cry1Ab getrennt werden können und dadurch keine klaren Aussagen zur Wirkung des Cry1Ab auf die Bodenmikroorganismengemeinschaft möglich sind.

In der vorliegenden Arbeit wurde bei der vierfach geringeren Anfangskonzentration von Cry1Ab in beiden Bodentypen kein Effekt nachgewiesen (siehe Kapitel 3, Abschnitt 3.3). Das lässt, auch in Hinblick auf die Ergebnisse anderer Arbeiten, darauf schließen, dass erst ab einer bestimmten Cry1Ab-Konzentration ($> 14 \mu\text{g g}^{-1}$) im Boden die Bodenmikroorganismengemeinschaft nachweisbar beeinflusst wird. Im Vergleich dazu wurden im Freiland im Rahmen dieser Arbeit (siehe Kapitel 1, Abschnitt 3.3.2) auf BT-Maisfeldern im Wurzelboden maximal $1,93 \text{ ng g}^{-1}$ Cry1Ab (TG) gemessen. Diese Cry1Ab-Konzentration ist etwa 30.000-mal geringer als die Konzentration, bei der in den hier durchgeführten Abbaubersuchen ein Effekt auf die Bodenmikroorganismengemeinschaft festgestellt wurde ($50 \mu\text{g g}^{-1}$ Cry1Ab). Auch in einem früheren Projekt, welches die Auswirkungen des BT-Maisanbaus auf die Bodenmikroorganismengemeinschaft in der Rhizosphäre untersuchte, wurden ähnliche Cry1Ab-Konzentrationen von durchschnittlich $1,62 - 1,70 \text{ ng g}^{-1}$ im Freiland gemessen und keine Effekte auf die Zusammensetzung der Bodenmikroorganismengemeinschaften nachgewiesen (Baumgarte & Tebbe, 2005). Es wurde gezeigt, dass die Struktur der Bodenmikroorganismengemeinschaften im Freiland weniger durch den Cry1Ab-Eintrag beim BT-Maisanbau als durch andere Umweltfaktoren, wie z.B. das Wachstumsstadium des Maises oder die natürlichen Feldheterogenitäten, beeinflusst wurde. Bekräftigt wird diese Vermutung durch die Ergebnisse weiterer Untersuchungen, die bei im Freiland vorkommenden Cry1Ab-Konzentrationen ebenfalls keine Effekte feststellten (Griffiths *et al.*, 2005, 2006, 2007; Icoz *et al.*, 2008a; Tan *et al.*, 2010). Somit ist nicht zu erwarten, dass sich durch den MON810-BT-Maisanbau in der landwirtschaft-

lichen Praxis aufgrund der Cry1Ab-Proteine Auswirkungen auf die Zusammensetzung der Bodenmikroorganismengemeinschaft ergeben.

6 Fazit

Die Überdauerung der gentechnisch veränderten Cry1Ab Proteine aus dem Mais MON810 wurde in dieser Arbeit mit Hilfe von Freiland- und Laboruntersuchungen ermittelt. Die Freilanduntersuchungen basierten auf Bodenproben-Analysen von landwirtschaftlichen Flächen auf denen ein MON810-BT-Maisanbau stattfand oder stattgefunden hatte, wobei durch die Standortauswahl Böden mit unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften berücksichtigt wurden. Die Freisetzung von Cry1Ab im Boden erfolgte sowohl über den Wurzelraum (Rhizosphäre) als auch nach der Ernte über die auf dem Feld verbliebenen Pflanzenreste – der letzte Faktor war dabei quantitativ, wie bereits von Baumgarte & Tebbe (2005) in anderen Untersuchungen belegt, deutlich wichtiger. Damit ließe sich theoretisch der Cry1Ab-Eintrag im Freiland durch das konsequente Ernten der ganzen Maispflanzen reduzieren; nach eigenen Untersuchungen etwa um den Faktor 7, wenn nur die Wurzelballen, nicht jedoch die oberirdischen Sprosse auf dem Feld verbleiben würden (siehe Kapitel 1, Abschnitt 3.3.6). Da sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Cry1Ab-Gehalt im Boden bei den unterschiedlichen Cry1Ab-Eintragsmengen ergaben, wurden die Vermutungen aus früheren Untersuchungen bestätigt, dass der Großteil des Cry1Ab schon im Pflanzenmaterial abgebaut wurde, bevor es den Boden erreichte (siehe Kapitel 1, Abschnitt 4.1). Um diesen Anteil quantitativ zu erfassen, müsste der Abbau des BT-haltigen Pflanzenmaterials in weiteren Laboruntersuchungen verfolgt werden.

Generell ist das Verhalten von Cry1Ab im Boden mit dem anderer Proteine vergleichbar. Die Ergebnisse des ^{14}C -Cry1Ab Abbaubversuchs bestätigten die Erkenntnisse aus Adsorptionsstudien, dass sich abhängig von der spezifischen Oberfläche und der zugeführten Proteinkonzentration ein Lösungsgleichgewicht einstellte, wobei ein Teil des Cry1Ab adsorbiert wurde und ein Teil in der Bodenlösung verblieb (siehe Kapitel 3, Abschnitt 4.2). Der Cry1Ab-Anteil in der flüssigen Phase unterlag einem schnellen biologischen Abbau, wie die $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzungsraten nach der ^{14}C -Cry1Ab-Zugabe zum Boden zeigten. Die Ergebnisse der PCR-SSCP-Analyse ließen hierbei den Schluss zu, dass bei den im Freiland maximal zu erwartenden Cry1Ab-Konzentrationen im Boden keine Veränderungen der Bodenmikroorganismengemeinschaft zu erwarten sind. Der Cry1Ab-Gehalt im Boden war hauptsächlich vom Tongehalt des Bodens abhängig. Dieser Zusammenhang zeigte sich signifikant in den Freilandmessungen und wurde durch die ^{14}C -Bilanzierung des ^{14}C -Cry1Ab-Abbaus bestätigt. Die signifikanten Unterschiede der gemessenen Cry1Ab-Gehalte

der Freilandböden zwischen den Standorten waren somit hauptsächlich auf eine stärkere Adsorption in den feinkornreichen Böden zurückzuführen. Zudem zeigte sich anhand der ^{14}C -Untersuchungen, dass der im Freilandboden insgesamt enthaltene Cry1Ab-Anteil, unabhängig von der Bodenart wahrscheinlich in der gleichen Größenordnung lag, wobei das Cry1Ab in feinkörnigeren Böden stärker gebunden war und anhand der auf Extraktion basierenden Messmethode ELISA schlechter erfasst wurde. Die ^{14}C -Messungen bewiesen jedoch, dass das Cry1Ab, trotz der Adsorption, auch im feinkörnigeren Boden kontinuierlich abgebaut wurde. Der limitierende Faktor beim Abbau des Cry1Ab ist deshalb offensichtlich nicht die Bodenmikroorganismengemeinschaft selbst, sondern die Desorptionsrate von Cry1Ab in die Bodenlösung. Die Desorptionsrate ist für jeden Boden individuell. Deshalb lassen negative Nachweise von Cry1Ab aus Bodenextrakten nicht, wie in früheren Studien geschehen, automatisch den Schluss zu, dass kein Cry1Ab mehr im Boden ist, sondern es kann sogar eine mögliche Akkumulation in besonders feinkörnigen, schwer extrahierbaren Böden für den Fall nicht ausgeschlossen werden, dass die Desorptionsraten niedriger sind als die Sorption über neu eingetragene Cry1Ab Proteine. Hinweise aus der Praxis für eine derartige Akkumulation gibt es jedoch nicht, da die Desorptionsraten und damit der Abbau offensichtlich deutlich höher sind, als der Eintrag wie er über Monokulturen erfolgen kann (vgl. Gruber *et al.*, 2011). In der wässrigen Bodenphase ist Cry1Ab äußerst instabil, da es, wie der Einbau von ^{14}C in die mikrobielle Biomasse belegt, eine attraktive Kohlenstoff- und Energiequelle für Bodenmikroorganismen darstellt.

7 Zusammenfassung

Gentechnisch veränderter MON810-BT-Mais, der das rekombinante insektizide Cry1Ab Protein synthetisiert, wird seit mehr als 20 Jahren weltweit angebaut. Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es, mit Hilfe von Freiland- und Laboruntersuchungen, den Abbau der Cry1Ab Proteine im Boden in Abhängigkeit von den Bodeneigenschaften zu charakterisieren und dabei zwischen Sorptions- und tatsächlichen Abbauprozessen zu differenzieren. Die Arbeit unterteilte sich in drei Teilabschnitte:

1. Quantifizierung des Cry1Ab-Gehaltes in Boden und Pflanzen während und nach des landwirtschaftlichen Anbaus von MON810-BT-Mais sowie Identifizierung wichtiger physikochemischer Bodeneigenschaften für die Überdauerung von Cry1Ab
2. Biotechnologische Produktion von ^{14}C -markiertem Cry1Ab mit Hilfe eines rekombinanten *Escherichia coli* Stamms mit dem Ziel die hergestellte Substanz für Abbauuntersuchungen zu verwenden
3. Untersuchung des Abbaus von ^{14}C -Cry1Ab in Böden unter Laborbedingungen und Differenzierung zwischen Sorptions- und Abbauprozessen

Während der Freilanduntersuchungen wurden die Cry1Ab-Gehalte in Extrakten aus Böden und Pflanzen mit einem kommerziell erhältlichen ELISA-Nachweisverfahren quantifiziert. Gleichzeitig wurden ausgewählte Bodeneigenschaften der Freilandböden (KAK, pH-Wert, C/N-Gehalt, Korngrößenverteilung, Wasserhaltekapazität, Biomassekohlenstoffgehalt) anhand standardisierter Methoden erfasst. Die Probenahmen erfolgten an 15 unterschiedlichen experimentellen bzw. landwirtschaftlichen Feldern im Nordosten Deutschlands. Auf jedem Feld wurden an mindestens fünf mit GPS verorteten Hauptpunkten Mischproben aus je drei Messunterpunkten genommen. Als Kontrollen dienten Böden angrenzender Felder, auf denen noch nie BT-Mais angebaut wurde. Die Ergebnisse wurden statistisch ausgewertet (ANOVA, T-Test) und es wurden nichtlineare Korrelationsanalysen (Rangkorrelation nach Spearman) zwischen den Bodenparametern und den Cry1Ab-Gehalten im Boden durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass im Freiland der Haupteintrag des Cry1Ab in den Boden nach der Ernte durch auf dem Feld verbliebene Maispflanzenreste erfolgte. Der größte Teil des Cry1Ab wurde während der Verrottung noch innerhalb der Pflanzenmatrix abgebaut, bevor es den Boden erreichte. Die messbaren Cry1Ab-Gehalte wurden durch Adsorption beeinflusst, was sich in der deutlichen Abhängigkeit zu einigen Bodeneigenschaften, insbesondere dem Tongehalt

wiederspiegelte. Außerdem deutete die signifikante Korrelation zum Biomassekohlenstoffgehalt auf einen möglichen standortspezifischen schnelleren biologischen Abbau. Nach etwa einem Jahr war, auch auf Feldern mit bis zu dreijährigem BT-Maisanbau in Folge, an keinem Standort mehr Cry1Ab im Boden detektierbar.

Parallel zu den Freilanduntersuchungen wurde ^{14}C -markiertes Cry1Ab mit dem gentechnisch veränderten *E. coli*-Stamm HB101 pMP hergestellt. Die ^{14}C -Markierung erfolgte durch die Zugabe von ^{14}C -Glycerin und ^{14}C -Leucin in das Nährmedium der Zellkultur. Um eine optimale Markierung zu erreichen wurde das Verhältnis zwischen markiertem und unmarkiertem Kohlenstoff im Nährmedium angepasst. Letztendlich gelang es ^{14}C -markiertes Cry1Ab mit spezifischen Aktivitäten von 8.000 - 36.000 dpm mg^{-1} und einer Reinheit von 81 - 99 % (w/w) herzustellen, das ausreichte um den Abbau zu untersuchen.

Der Abbau des ^{14}C -Cry1Ab wurde im geschlossenen System unter Laborbedingungen anhand von ^{14}C -Massenbilanzen in zwei Bodenarten die sich hauptsächlich im Ton- und Sandgehalt unterschieden (Sand und Lehm) verfolgt. Unabhängig von der Bodenart wurde nach einer Inkubationsdauer von 30 Tagen an den ^{14}C -Massenbilanzen über das freigesetzte $^{14}\text{CO}_2$, das ^{14}C im Biomassekohlenstoff sowie den im Boden verbliebenen ^{14}C -Rest ersichtlich, dass ein Teil direkt nach der Zugabe adsorbiert wurde, während der andere Teil einem schnellen biologischen Abbau unterlag. Dabei wurden im Sand höhere $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzungsraten gemessen, was auf die stärkere Adsorption des Proteins an die Tonfraktion im Lehm zurückzuführen war. Die zusätzlich durchgeführten PCR-SSCP-Analysen zeigten, dass bei den im Freiland maximal möglichen Cry1Ab-Eintragsmengen, die etwa 30.000-fach geringer sind als die hier eingesetzten ^{14}C -Cry1Ab-Konzentrationen, keine Auswirkungen auf die Bodenmikroorganismengemeinschaft zu erwarten sind. Unabhängig von der Bodenart und der eingesetzten Cry1Ab-Menge wurde zudem in den über 101 bzw. 136 Tage weitergeführten Ansätzen ein kontinuierlich fortlaufender ^{14}C -Cry1Ab-Abbau festgestellt, der eine langsam stattfindende Desorption des Proteins mit anschließendem mikrobiellen Abbau belegte.

Der ^{14}C -Cry1Ab-Abbauversuch bewies, dass Cry1Ab im Boden, genau wie andere Proteine auch, rasch abgebaut wird. Der limitierende Faktor für die Mineralisation des Cry1Ab ist dabei nicht die Bodenmikroorganismengemeinschaft, sondern die individuelle Desorptionsrate in den jeweiligen Böden. Demnach müssen Ergebnisse bisheriger Studien, die einen Abbau von Cry1Ab ausschließlich aufgrund von Nachweisverfahren aus Bodenextrakten gefolgert haben, anhand der standortspezifischen Bodeneigenschaften neu bewertet werden.

8 Summary

Genetically engineered MON810-BT-maize, synthesizing the recombinant insecticidal protein Cry1Ab, is agriculturally used worldwide since more than 20 years. The aim of this study was to analyze the degradation of Cry1Ab in soil and to determine its sorption effect in contrast to its degradation process. The study was conducted in three steps:

- 1. Quantification of the Cry1Ab in plants and soil during and after the cultivation period of MON810-BT-maize as well as identification of physicochemical soil properties influencing the degradation*
- 2. Biotechnological synthesis of ^{14}C -Cry1Ab with a genetically engineered Escherichia coli cell culture granting a degradation study with ^{14}C -mass balances*
- 3. Investigation of the fate of ^{14}C -Cry1Ab in soil under laboratory conditions to differentiate between sorption and degradation*

The yields of Cry1Ab in plants and soils during the field study were detected with a commercially available ELISA-Kit for quantification of Cry1Ab/Cry1Ac. In addition, the physicochemical soil properties (cation exchange capacity, pH, C/N-content, grain-size distribution, water holding capacity, content of C in soil biomass) were analyzed by standard methods. The samples were collected from a total of fifteen experimental and agricultural fields in northeast Germany. On each field, at least five positions were defined by GPS and for each position mixed-samples from three equidistant sampling points were collected. Soil samples from neighboring fields with no history of BT-maize cultivation served as controls. All resulting data were statistically analyzed (ANOVA, T-Test) and nonlinear correlations (Spearman's rank order correlation) between Cry1Ab-contents and soil properties were extracted. The results show, that after the harvest the remaining maize-plant residues are mainly responsible for the Cry1Ab-input into the soil. However, the main part of the Cry1Ab already degrades as the residues are decomposed, before even released into the soil. There are significant correlations between soil properties and the amount of Cry1Ab, particularly to the content of clay and sand. Hence, the detected Cry1Ab-concentrations in soil clearly are depending on adsorption processes. Furthermore the significant correlation between Cry1Ab and the C-content of the soil biomass indicates a possible faster biological degradation on some field sites. One year after the cropping season no detectable Cry1Ab remains in the soil, even on field sites with a successive cultivation period of two or three years of BT-maize.

For the study of the fate of Cry1Ab in soil under laboratory conditions ^{14}C -labeled Cry1Ab was produced through a modified method using genetically engineered E. coli cells (HB101 pMP). The ^{14}C -labeling was achieved by the addition of ^{14}C -glycerine and ^{14}C -leucine to the nutrient solution. For an effective labeling the optimal ratio between labeled and unlabeled carbon had to be optimized. Finally ^{14}C -labeled Cry1Ab with specific activities of 8.000 - 36.000 dpm mg^{-1} and a purity of 81 - 99 % (w/w) was produced, which sufficed for the intended degradation study.

The degradation of ^{14}C -Cry1Ab was studied in a closed system under laboratory conditions by ^{14}C -mass balances including the released $^{14}\text{CO}_2$, the ^{14}C incorporated in soil biomass, and the remaining ^{14}C in the residue soil. The experiment was conducted with two soils (sand and loam), which differ mainly in the content of clay and sand. The ^{14}C -mass balances show that, after the addition, one part of the ^{14}C -Cry1Ab was directly adsorbed to the soil and the other part was rapidly biologically degraded. In sand higher rates of released $^{14}\text{CO}_2$ were detected, because of the stronger Cry1Ab-adsorption on the clay fraction of the loam. The results of the additional performed PCR-SSCP-analyses indicates that there will be no effects on the soil bacterial community at the maximum possible amount of Cry1Ab-input into the field soil, which is ca. 30,000 fold smaller than the used ^{14}C -Cry1Ab amount in this degradation study. The over 100 days ongoing ^{14}C -Cry1Ab-degradation proves the steady desorption of the adsorbed ^{14}C -Cry1Ab in connection with microbial degradation.

The study of the ^{14}C -Cry1Ab degradation demonstrates that Cry1Ab rapidly degrades in soil like other proteins. Therefore the limiting factor for the mineralization of Cry1Ab is not the soil bacterial community, but the distinct desorption rate of the soil. Accordingly, conclusions from previous studies which explained degradation exclusively by the decline of Cry1Ab in soil extracts should be reconsidered in the light of the soil properties of the respective field sites.

9 Literatur

Accinelli, C.; Koskinen, W.C.; Becker, J.M.; Sadowsky, M.J. (2008): Mineralization of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac endotoxin in soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 56 (3), 1025-1028

Alef, K. (1991): *Methodenhandbuch Bodenmikrobiologie*. Ecomed Verlagsgesellschaft mbH, Justus von Liebig Str. 1, 8910 Landsberg/Lech

Altieri, M.A.; Francis, C.A.; Van Schoonhoven, A.; Doll, J.D. (1978): A review of insect prevalence in maize (*Zey mays* L.) and bean (*Phaseolus vulgaris* L.) polycultural systems. *Field Crops Research*, Vol.1, 33-49

Aschkinass, E. & Caspari, W. (1901): Über den Einfluss dissociirender Strahlen auf organisierte Substanzen, insbesondere über die bakterienschädigende Wirkung der Becquerel-Strahlen. *Archiv für die gesammte Physiologie des Menschen und der Thiere*, 86, 603-618

Badea, E.M.; Chelu, F.; Lacatusu, A. (2010): Results regarding the levels of Cry1Ab protein in transgenic corn tissue (MON810) and the fate of *Bt* protein in three soil types. *Romanian Biotechnological Letters*, Vol. 15(1), 55-62

Bai, Y.; J, M.; C, J. (2007): Insecticidal protein in leaf-blade powders of transgenic *Bt* rice. *Agricultural Sciences in China*, Vol.6 (2), 167-174

Baumgarte, S.; Tebbe, C. C. (2005): Field studies on the environmental fate of the Cry1Ab *Bt* toxin produced by transgenic maize (MON810) and its effect on bacterial communities in the maize rhizosphere. *Molecular Ecology*, 2539-2551

Benedict, J.H.; Ring, D.R. (2004): Transgenic crops expressing *Bt* proteins: current status, challenges and outlook. In: Koul, O.; Dhaliwal, G.S. (Eds.), *Transgenic Crop Protection: Concepts and Strategies*. Science Publishers, Inc. Enfield, NH, USA, 15-83

Berliner, E. (1915): Über die Schlaffsucht der Mehlmottenraupe (*Ephestia kühniella* Zell.) und ihren Erreger *Bacillus thuringiensis* sp. Z., *Angewandte Entomology*, Vol. 2, 29-56

Bowers, E.; Hellmich, R.; Munkvold, G. (2014): Comparison of fumonisin contamination using HPLC and ELISA methods in bt and near-isogenic maize hybrids infested with European corn borer or Western bean cutworm. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 62 (27), 6463-6472

Bundesanstalt für Geowissenschaften und Rohstoffe (Hrsg.) (1994): *Bodenkundliche Kartieranleitung*, 4. Aufl., Hannover

Butenschoen, O.; Ji, R.; Schaffer, A.; Scheu, S. (2009): The fate of chatechol in soil as affected by earthworms and clay. *Soil Biology and Biochemistry*, Vol. 41, Issue 2, 330-339

Calamai, L.; Lozzi, L.; Stotzky, G.; Fusi, P.; Ristori, G. (2000): Interaction of catalase with montmorillonite homoionic to cations with different hydrophobicity: effect on enzyme activity and microbial utilization. *Soil Biology and Biochemistry*, Vol. 32, 815-823

Carrio, M.M.; Villaverde, A. (2001): Protein aggregation as bacterial inclusion bodies is reversible. *FEBS Letters*, Vol. 489, Issue 1, 29-33

Castaldini, M.; Turrini, A.; Sbrana, C.; Benedetti, A.; Marchionni, M.; Mocali, S.; Fabiani, A.; Landi, S.; Santomassimo, F.; Pietrangeli, B.; Nuti, M. P.; Miclaus, N.; Giovanetti, M. (2005): Impact of *Bt* Corn on Rhizospheric and Soil Eubacterial Communities and on Beneficial Mycorrhizal Symbiosis in Experimental Microcosms. *Applied and Environmental Microbiology*, 6719-6729

Chabra, R.; Pleysier, I.; Cremers, A. (1975): The measurement of CEC and exchangeable cations in soils. S. Bailey (Ed.) *Proceedings of the International Clay Conference, Mexico*, 439, Appl. Publ. Ltd. Wilmette, USA

Cheshire, M.V.; Christensen, B.T.; Sorensen, L.H. (1990): Labeled and native sugars in particle-size fractions from soil incubated with ¹⁴C straw for 6 to 18 years. *Journal of Soil Science*, Vol. 41, Issue 1, 29-39

Chevallier, T.; Muchaonyerwa, P.; Chenu, C. (2001): Microbial utilisation of two proteins adsorbed to a vertisol clay fraction: toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* and bovine serum albumin. *Soil Biology and Biochemistry* 35, 1211-1218

Clark, E.D. (2001): Protein refolding for industrial processes. *Current Opinion in Biotechnology*, Vol. 12 (2), 202-207

Crecchio, C.; Stotzky, G. (1998): Insecticidal activity and biodegradation of the toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* bound to humic acids from soil. *Soil Biology and Biochemistry*, Vol. 30, 463-470

Crecchio, C.; Stotzky, G. (2001): Biodegradation and insecticidal activity of the toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* bound on complexes of montmorillonite-humic acids-Al hydroxypolymers. *Soil Biology and Biochemistry*, Vol. 33, 573-581

Crickmore, N.; Zeigler, D.R.; Feitelson, J.; Schnepf, E.; Van Rie, J.J.; Lereclus, D.; Baum, J.; Dean, D.H. (1998): Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Vol. 62, 807-813

Degenhardt, H.; Horstmann, F. und Mülleder, N. (2003): *Bt*-Mais in Deutschland. *Mais*, Vol. 31 (2): 75-77

Diercke Weltatlas (1992): Deutschland - physisch, Maßstab 1 : 1 500 000, 3. Auflage, Westermann Schulbuchverlag GmbH, Braunschweig, 16-23

- Dohrmann A.B.; Tebbe C.C. (2004): Microbial community analysis by PCR-single-strand conformation polymorphism (PCR-SSCP), *In* Kuwalchuk, G.A.; de Bruijn, F.J.; Head, I.M.; Akkermans, A.D.; van Elsas, J.D. (Eds.), *Molecular Microbial Ecology Manual*. Kluwer Academic Publishers, Printed in the Netherlands, 809-838
- Dohrmann, R. (2006): Cation Exchange Capacity Methodology II: proposal for a modified silver-thiourea method. *Applied Clay Science*, Vol. 34, 38-46
- Douville, M.; Gagne, F.; Masson, L.; McKay, J.; Blaise, C. (2005): Tracking the source of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab endotoxin in the environment. *Biochemical Systematics and Ecology*, Vol. 33, 219-232
- Douville, M.; Gagné, F. ; Blaise, C. und André, C. (2007): Occurrence and persistence of (*Bt*) and transgenic *Bt* corn Cry1Ab gene from an aquatic environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 66, No. 2, 195-203
- Dubelmann, S.; Ayden, B.R.; Bader, B.M.; Brown, C.R.; Jiang, C.; Vlachos, D. (2005): Cry1Ab protein does not persist in soil after 3 years of sustained *Bt* corn use. *Environmental Entomology*, Vol. 34, 915-921
- Emberlin, J.; Adams-Groom, B. and Tidmarsh, J. (1999): The dispersal of maize (*Zea mays*) pollen. A report based on evidence available from publications and internet sites. A report commissioned by the Soil Association: National Pollen Research Unit, University College Worcester, Worcester, UK
- Fahnert, B.; Lilie, H.; Neubauer, P. (2004): Inclusion bodies: formation and utilisation. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Vol. 89, 93-142
- Fahrmeier, L.; Künstler, R.; Pigeot, I.; Tutz, G. (2007): Statistik - Der Weg zur Datenanalyse. 6. überarbeitete Auflage; Springer Verlag Berlin Heidelberg
- Feng, Y.; Ling, L.; Fan, H.; Liu, Y.; Tan, F.; Shu, Y.; Wang, J. (2011): Effects of temperature, water content and pH on degradation of Cry1Ab protein released from *Bt* corn straw in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, Vol. 43, 1600-1606
- Fierer, N.; Schimel, J.P. (2002): Effects of drying-rewetting frequency on soil carbon and nitrogen transformations. *Soil Biology and Biochemistry*, Vol. 34, 777-787
- Flores, S.; Saxena, D.; Stotzky, G. (2005): Transgenic *Bt* plants decompose less in soil than non-*Bt* plants. *Soil Biology and Biochemistry*, Vol. 37, 1073-1082
- Fu, Q.; Deng, Y.; Li, H.; Liu, J.; Hu, H.; Chen, S.; Sa, T. (2009): Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies on the adsorption of the toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* by clay minerals. *Applied Surface Science*, Vol. 255, 4551-4557
- Gamarnik, M.Y.; Brik, A.B. (2006): On the Mechanism of Crystal Amorphization under the Influence of Radioactive Impurities. *Physica status solidi (a)*, Vol. 126 (1), 23 - 27

Gisi, U.; Schenker, R.; Schulin, R.; Stadelmann, F.X.; Sticher, H. (1997): Bodenökologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart

Gordon, A.S.; Millero, F.J. (1985): Adsorption-mediated decrease in the biodegradation rate of organic compounds. *Microbial Ecology*, Vol. 11, 289-298

Griffith, P.C.; Fletcher, M. (1991): Hydrolysis of protein and model dipeptide substrates by attached and non-attached marine *Pseudomonas* sp. Strain NCIMB(2021). *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 57, 2186-2191

Griffiths, B.S.; Caul, S.; Thompson, J.; Birch, A.N.E.; Scrimgeour, C.; Andersen, M.N.; Cortet, J.; Messéan, A.; Sausse, C.; Lacroix, B.; Krogh, P.H. (2005): A comparison of soil microbial community structure, protozoa and nematodes in field plots of conventional and genetically modified maize expressing the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *Plant and Soil*, Vol. 275, 135-146

Griffiths, B. S.; Caul, S.; Thompson, J.; Nicholas, A.; Birch A.N.E.; Srimgeour, C.; Cortet, J.; Foggo, A.; Hackett, C.; Krogh, P.H. (2006): Soil microbial and faunal community responses to *Bt* maize and insecticide in two soils. *Journal of Environmental Quality*, Vol. 35, 734-741

Griffiths, B. S.; Heckmann, L.-H.; Caul, S.; Srimgeour, C.; Thompson, J.; Krogh, P.H. (2007): Varietal effects of eight paired lines of transgenic *Bt* maize and near-isogenic non *Bt*-maize on soil microbial and nematode community structure. *Plant Biotechnology Journal*, Vol. 5, 60-68

Gruber, H.; Paul, V.; Meyer, H.H.D.; Müller, M. (2009): Validation of an enzyme immunoassay for monitoring Cry1Ab toxin in soils planted with *Bt*-maize (MON810) in a long-term field trial on four South German sites. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, Vol. 3, Supplement 2, 22-25

Gruber, H.; Paul, V.; Meyer, H.D.H.; Müller, M. (2011): Determination of insecticidal Cry1Ab protein in soil collected in the final growing seasons of a nine-year field trial of *Bt*-maize MON810. *Transgenic Research*, Vol. 21 (1), 77-88

Hails, R.S. (2000): Genetically modified plants - the debate continues. *Trends in Ecology and Evolution*, Vol. 15, 14-18

Head, G.; Surber, J.B.; Watson, J.A.; Martin, J.W.; Duan, J. (2002): No detection of Cry1Ac protein in soil after multiple years of transgenic *Bt* cotton (Bollgard) use. *Environmental Entomology*, Vol. 30, 30-36

Höfte, H.; Whiteley, H.R. (1989): Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological Reviews*, Vol. 53, 242-255

Hopkins, D.W.; Gregorich, E.G. (2003): Detection and decay of the *Bt* endotoxin in soil from a field trial with genetically modified maize. *European Journal of Soil Science*, Vol. 54, 793-800

- Hopkins, D.W.; Gregorich, E.G. (2004): Decomposition of residues and loss of the δ -endotoxin from transgenic (*Bt*) corn (*Zea mays* L.) in soil. Canadian Journal of Soil Science, 19-26
- Hommel, B.; Schorling, M.; Langenbruch, G.A. (2006): Wie den Maiszünsler bekämpfen? Mais, Vol.3, 117-119
- Icoz, I.; Saxena, D.; Andow, D.A.; Zwahlen, C.; Stotzky, G. (2007): Microbial populations and enzyme activities in soil in situ under transgenic corn expressing cry proteins from *Bacillus thuringiensis*. Journal of Environmental Quality, Vol. 37, 647-662
- Icoz, I.; Saxena, D.; Andow, D.; Zwahlen, C.; Stotzky, G. (2008a): Microbial populations and enzyme activities in soil in situ under transgenic corn expressing Cry proteins from *Bacillus thuringiensis*. Journal of Environmental Quality, Vol. 37, 647-662
- Icoz, I.; Stotzky, G. (2008b): Fate and effects of insect-resistant *Bt* crops in soil ecosystems. Soil and Biochemistry, Vol. 40, 559-586
- Ishii, N.; Koiso, H.; Takeda, H.; Uchida, S. (2010): Partitioning of ^{14}C into solid, liquid, and gas phases in various paddy soils in Japan. Journal of Nuclear Science Technology, Vol. 47, Issue 3, 238-243
- Ishwata, S. (1901) : On a kind of severe flasherie (sotto disease), Danihan Sanbshi Kaiho, Vol. 9, 1-5
- Jehle, J. (2006): Mündliche Mitteilung, Tagung des BMBF-BT-Mais-Verbundes, 24.03.2006, DLR Rheinpfalz, Phytomedizin, Neustadt
- Jenkinson, D.S.; Powelson, D.S.; Wedderburn, R.W.M. (1976): The effects of biocidal treatments on metabolism in soil - III. The relationship between soil biovolume, measured by optical microscopy, and the flush of decomposition caused by fumigation. Soil Biology and Biochemistry, Vol. 8, 189-202
- Jones, M.D.; Newell, L.C. (1948): Longevity of Pollen and Stigmas of Grasses: Buffalo-grass. *Buchloe dactyloides* (Nutt.) Engelm., and Corn *Zea mays* L. Journal of the American Society of Agronomy, Vol. 40 (3), 195-204
- Jungbauer, A.; Kaar, W. (2007): Current status of technical protein refolding. Journal of Biotechnology, Vol. 128 (3), 587-596
- Kapralek, F.; Ječmen, P.; Sedláček, J.; Fábry, M.; Zadražil, S. (1991): Fermentation conditions for high-level expression of the tac-promoter-controlled calf prochymosin cDNA in *Escherichia coli* HB101, Biotechnology and Bioengineering, Vol. 37, 71-79
- Kleijn, M.; Norde, W. (1995): The adsorption of proteins from aqueous solution on solid surfaces. Heterogeneous Chemistry Reviews, Vol. 2 (3), 157-172

Knowles, B.H. (1994): Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal delta-endotoxins. *Advances in Insect Physiology*, Vol. 24, 275-308

Koskella, J.; Stotzky, G. (1997): Microbial utilization of free and clay-bound insecticidal toxins from *Bacillus thuringiensis* and their retention of insecticidal activity after incubation with microbes. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 63, 3561-3568

Kropf, S.; Heuer, H.; Grüning, M.; Smalla, K. (2004): Significance test for comparing complex microbial community fingerprints using pairwise similarity measures. *Journal of Microbial Methods*, Vol. 57, 187-195

Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature (London)*, Vol. 227, 680-685

Lancashire, P. D.; Bleiholder, H.; Langelüddecke, P.; Stauss, R.; Van den Boom, T.; Weber, E.; Witzten-Berger, A. (1991): An uniform decimal code for growth stages of crops and weeds. *Annals of applied Biology*, Vol. 119, 561-601

Landi, S.; Held, H.R.; Hauschild, A.H.W.; Hilsheimer, R. (1967): Preparation of ¹⁴C-labeled tuberculin purified protein derivative. *Applied Microbiology*, Vol. 15 (4), 839-843

Landi, S.; Held, H.R.; Tseng, M.C. (1970): Comparative study of ¹⁴C-labeled purified protein derivative from various mycobacteria. *Applied Microbiology*, Vol. 20 (5), 696-703

Lea, D.E.; Haines, R.B.; Coulson, C.A. (1937): The action of radiations on bacteria. *Proceedings of the Royal Society B (London)*, Vol. 1234, 1-21

Leser, H.; Haas, H.D.; Mosimann, T.; Paesler, R. (1995): Wörterbuch der allgemeinen Geographie. 8. Auflage, Deutscher Taschenbuchverlag GmbH & Co. KG, München und Westermann Schulbuchverlag GmbH, Braunschweig

Levene, H. (1960): Robust tests for equality of variances. In: Ingram Olkin, Harold Hotelling *et al.* (Hrsg.): *Contributions to Probability and Statistics: Essays in Honor of Harold Hotelling*, Stanford University Press, 278-292

Liebe, D. (2004): Molekulargenetische Untersuchungen zur Abgrenzung von Populationen des Maiszünslers *Ostrinia nubilalis* Hübner als seine Voraussetzung für das Insektenresistenzmanagement (IRM) von *Bacillus thuringiensis*-Mais (BT-Mais). Dissertation, November 2004, Justus-Liebig-Universität Giessen

Madliger, M.; Sander, M.; Schwarzenbach, R.P. (2010): Adsorption of Transgenic Insecticidal Cry1Ab Protein to SiO₂. 2. Patch-Controlled Electrostatic Attraction. *Environmental Science & Technology*, Vol. 44, 8877-8883

Madliger, M.; Gasser, C. A.; Schwarzenbach, R.P.; Sander, M. (2011): Adsorption of Transgenic Insecticidal Cry1Ab Protein to Silica Particles. Effects on Transport and Bioactivity, *Environmental Science & Technology*, Vol. 45, 4377-4384

- Magdaliniuk, S.; Block, J.C.; Leyval, C.; Bottero, J.Y.; Villemin, G.; Babut, M. (1995): Biodegradation of naphthalene in montmorillonite/polyacrylamide suspensions. *Water Science and Technology*, Vol. 31, 85-94
- Marchetti, E.; Accinelli, C.; Talame, V.; Epifani, R. (2007): Persistence of Cry toxins and cry genes from genetically modified plants in two agricultural soils. *Agronomy for Sustainable Development*, Vol. 27, 231-236
- Margarit, E.; Reggiardo, M.I.; Permingeat, H.R. (2008): *Bt* protein rhizosecreted from transgenic maize does not accumulate in soil. *Electronic Journal of Biotechnology*, Vol.11 (2), 1-10
- Martens, R. (2007): Mündliche Mitteilung am 21.08.2007, Johann Heinrich von Thünen Institut, Institut für Biodiversität, Braunschweig
- Masson, L.; Prefontaine, G.; Peloquin, L.; Lau, P.C.K.; Brousseau, R. (1990): Comparative analysis of the individual protoxin compound in P1 crystals of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* isolates NRD-12 and HD-1, *Biochemical Journal*, Vol. 269, 507-512
- McIntosh, S.C.; Stone, T.B.; Sims, S.R.; Hunst, P.L.; Greenplate, J.T.; Marrone, P.G.; Perlak, F.J.; Fischhoff, D.A. und Fuchs, R.L. (1990): Specificity and efficacy of purified *Bacillus thuringiensis* proteins against agronomically important insects. *Journal of Invertebrate Pathology*, Vol. 56, 258-266
- Mendelsohn, M.; Kough, J.; Vaituzis, Z.; Matthews, K. (2003): Are *Bt* crops safe? *Nature Biotechnology*, Vol. 21 (9), 1003-1009
- Middelberg, A.P. (2002): Preparative protein refolding. *Trends in Biotechnology* 20 (10), 437-443
- Miethling-Graff, R.; Dockhorn, S.; Tebbe, C.C. (2010): Release of the recombinant Cry3Bb1 protein of *Bt* maize MON88017 into field soil and detection of effects on the diversity of rhizosphere bacteria. *European Journal of Soil Biology*, Vol. 46 (1), 41-48
- Muchaonyerwa, P; Waladde, S; Nyamugafata, P.; Mpepereki, S.; Ristori, G.G. (2004): Persistence and impact on microorganisms of *Bacillus thuringiensis* proteins in some Zimbabwean soils. *Plant and Soil*, Vol. 266, 41-46
- Negi, A.S.; Anand, S.C. (1986): A textbook of physical chemistry. John Wiley & Sons (Asia) Pte Ltd, New Delhi
- Nguyen, T.H. (2004): Sicherheitsforschung und Monitoringmethoden zum Anbau von *Bt* Mais: Expression, Nachweis und Wirkung von rekombinanten Cry1Ab in heterologen Expressionssystemen. Dissertation, Georg-August-Universität, Göttingen
- Nguyen, T.H.; Jehle, J.A. (2007): Quantitative analysis of the seasonal ad tissue-specific expression of Cry1Ab in transgenic maize MON810. *Journal of Plant Diseases and Protection*, Vol. 114 (2), 82-87

Orita, M.; Iwahana, H.; Kanazawa, H.; Hayashi, K. and Sekiya, T. (1989): Detection of polymorphisms of human DNA by gel-electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 86, 2766-2770

Ottow, J.C.G. (2011): *Mikrobiologie von Böden - Biodiversität, Ökophysiologie und Metagenomik*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg 2011

Pacinnotti, G. & Porcelli, V. (1899): *Acione microbica esercitata dai raggi Becquerel su alcuni microorganismi patogeni*. Florence. After Index Medicus, 1899. Cited by Buchanan und Fulmer. *Physiology and biochemistry of bacteria*. Vol. II, Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md.

Pagel-Wieder, S.; Gessler, F.; Niemeyer, J.; Schröder, D. (2004): Adsorption of the *Bacillus thuringiensis* toxin (Cry1Ab) on Na-montmorillonite and on the clay fractions of different soils. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, Vol. 167, 184-188

Pagel-Wieder, S.; Niemeyer, J.; Fischer, W.; Gessler, F. (2007): Effects of physical and chemical properties of soil on adsorption of the insecticidal protein (Cry1Ab) from *Bacillus thuringiensis* at Cry1Ab protein concentrations relevant for experimental field sites. *Soil Biology and Biochemistry*, Vol. 39, 3034-3042

Palm, C. J.; Donegan, H.; Harris, D.; Seidler, R.J. (1994): Quantification in soil of *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* δ -endotoxin from transgenic plants. *Molecular Ecology*, Vol.3, 145-151

Palm, C. J.; Schaller, D. L.; Donegan, K. K.; Seidler, R. J. (1996): Persistence in soil of transgenic plant produced *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* δ -endotoxin; *Canadian Journal of Microbiology*, Vol. 42, 1258-1262

Paul, D.C.; Van Frank, R.M.; Muth, W.L.; Ross, J.W.; Williams, D.C. (1983): Immunocytochemical demonstration of human proinsulin chimeric polypeptide within cytoplasmic inclusion bodies of *Escherichia coli*. *European Journal of Cell Biology*, Vol. 31(2),171-204

Paul, V.; Guertler, P.; Wiedemann, S.; Meyer, H.H.D. (2010): Degradation of Cry1Ab protein from genetically modified maize (MON810) in relation to dietary feed proteins in dialy cow digestion. *Transgenic Research*, Vol. 19(4), 683-689

Pfeiffer, R. & Friedberger, E. (1903): Über die bakterientötende Wirkung der Radiumstrahlen. *Klinische Wochenschrift*, Vol. 40, 640-641

Pleysir, J. L. and A.S.R. Juo (1980): A single-extraction method using silver-thiourea for measuring exchangeable cations and effective CEC in soils with variable charges. *Soil Science*, Vol. 129, 205-211

Prihoda, K.R.; Coats, J.R. (2008): Fate of *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry3Bb1 protein in a soil microcosm. *Chemosphere*, Vol. 73 (7), 1102-1107

- Przybylski, M.; Becker, S.; Kayser, M.; Gorbunoff, A.; Pompe, W.; Rödel, G.; Krause-Buchholz, U. (2008): Verfahren und Vorrichtung zur Durchführung einer orts aufgelösten Lokal- und Verteilungsanalyse und zur quantitativen Bestimmung von Elementkonzentrationen. Patentblatt, Dokumentidentifikation DE10354787B4 03.01.2008
- Quiquampoix, H. (2000): Mechanisms of protein adsorption on surfaces and consequences for soil extracellular enzyme activity. In: Bollag, J.-M.; Stotzky, G. (Eds.), Soil Biochemistry 10, Marcel Dekker, New York, 171-206
- Richter, G. (2003): Praktische Biochemie - Grundlagen und Techniken, Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Rissler, J.; Mellon, M. (1996): The ecological risk of engineered crops. Massachusetts Institut of Technology, Cambridge, MA
- Roberts, M.J.; Russo, R. (1999): Student's Guide to Analysis of Variance. Routledge Chapman & Hall, 14. Januar 1999, S. 71
- Sambrook, J.; Russell, D.W. (2001): Molecular Cloning - A Laboratory Manual. Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Sander, M.; Madliger, M.; Schwarzenbach, R.P. (2010): Adsorption of Transgenic Insecticidal Cry1Ab Protein to SiO₂. 1. Forces Driving Adsorption. Environmental Science & Technology, Vol. 44, 8870-8876
- Saxena, D.; Flores, S.; Stotzky, G. (1999): Insecticidal toxin in root exudates from *Bt* corn. Nature, Vol. 402 (6761), 480
- Saxena, D.; Stotzky, G. (2000): Insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* is released from roots of transgenic *Bt* corn *in vitro* and *in situ*. FEMS Microbiology Ecology, Vol.33 (1), 35-39
- Saxena, D.; Stotzky, G. (2001a): *Bt* toxin uptake from soil by plants. Nature Biotechnology, Vol. 19, 199
- Saxena, D.; Stotzky, G. (2001b): *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) toxin released from root exudates and biomass of *Bt* corn has no apparent effect on earthworms, nematodes, protozoa, bacteria, and fungi in soil. Soil Biology and Biochemistry, Vol. 33, 1225-1230
- Saxena, D.; Flores, S.; Stotzky, G. (2002a): *Bt* toxin is released in root exudates from 12 transgenic corn hybrids representing three transformation events. Soil Biology and Biochemistry, Vol. 34, 133-137
- Saxena, D.; Flores, S.; Stotzky, G. (2002b): Vertical movement in soil of insecticidal Cry1Ab protein from *Bacillus thuringiensis*. Soil Biology and Biochemistry, Vol.34 (1), 111-120

Saxena, D.; Stewart, C.N.; Altosaar, I.; Shu, Q. und Stotzky, G. (2004): Larvicidal Cry proteins from *Bacillus thuringiensis* are released in root exudates of transgenic *Bacillus thuringiensis* corn, potato, and rice but not from *Bacillus thuringiensis* canola, cotton, and tobacco. *Plant Physiology and Biochemistry*, Vol.42 (5), 383-387

Schachtschabel, P.; Blume, H.-P.; Brümmer, G.; Hartge, K.H.; Schwertmann, U. (1998): *Lehrbuch der Bodenkunde*, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart

Schlichting, E., H. P. Blume und K. Stahr (1995): *Bodenkundliches Praktikum*. 2. neubearbeitete Auflage - Berlin; Oxford [u.a.]: Blackwell Wissenschafts-Verlag

Schmidt, C.F. (1948): The effect of radioactive phosphorus upon a suspension of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, Vol. 55 (5), 705-710

Schnepf, E.; Crickmore, N.; Van Rie, J.J.; Lereclus, D.; Baum, J.; Feitelson, J.; Zeigler, D.R.; Dean, D.H. (1998): *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Vol. 62, 775-806

Schwieger, F.; Tebbe, C.C. (1998): A new approach to utilize PCR-Single-Strand-Conformation polymorphism for 16 rRNA gene-based microbial community analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 64 (12), 4870-4876

Scott, P.; Pollack, L.M. (2005): Transgenic Maize. *Starch/Stärke*, Vol. 57, 187-195

Spearman, C. (1904): The Proof and Measurement of Association between Two Things. *The American Journal of Psychology*, Vol. 15 (1), 72-101

Stevenson, F.J. (1982): *Nitrogen in agricultural soils*. Soil Science Society of America, Madison, WI

Stolz, W. (2005): *Radioaktivität: Grundlagen - Messungen - Anwendungen*, 5. Auflage, Teubner Verlag/GWV Fachverlage GmbH, Wiesbaden

Stotzky, G. (2000): Persistence and biological activity in soil of insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* and of bacterial DNA bound on clays and humic acids. *Journal of Environmental Quality*, Vol. 29, 691-705

Stotzky, G. (2002): Release, persistence and biological activity in soil of insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis*. In: Letourneau, D.K., Burrows, B.E. (Eds.), *Genetically Engineered Organisms: Assessing Environmental and Human Health Effects*. CRC Press, Boca Raton, 187-222

Stotzky, G. (2004): Persistence and biological activity in soil of insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis*, especially from transgenic plants. *Plant and Soil*, Vol. 266, 77-89

Tabashnik, B.E. (1994): Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annual review of Entomology*, Vol. 39, 47-49

- Takahashi, M.; Maraboeuf, F.; Norden, B. (1996): Locations of functional domains in the RecA protein - Overlap of domains and regulation of activities. *European Journal of Biochemistry*, Vol. 242 (1), 20-28
- Tan, F.; Wang, J.; Feng, Y.; Chi, G.; Kong, H.; Qiu, H.; Wei, S. (2010): *Bt* corn plants and their straw have no apparent impact in soil microbial communities. *Plant Soil*, Vol. 329, 349-364
- Tank, J.L.; Rosi-Marshall, E.J.; Royer, T.V.; Whiles, M.R.; Griffiths, N. A.; Frauendorf, T.C.; Treering, D.J. (2010): Occurrence of maize detritus and a transgenic insecticidal protein (Cry1Ab) within the stream network of an agricultural landscape. *Proceedings of the National Academy of Science*, Vol. 107 (41), 17645-17650
- Tapp, H.; Calamai, L.; Stotzky, G. (1994): Adsorption and binding of the insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and subsp. *tenebrionis* on clay minerals. *Soil Biology and Biochemistry*, Vol. 26, 663-679
- Tapp, H.; Stotzky, G. (1995): Insecticidal activity of the toxins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and *tenebrionis* adsorbed and bound on pure and soil clays. *Applies and Environmental Microbiology*, Vol. 61, 1786-1790
- Tapp, H.; Stotzky, G. (1998): Persistence of the insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, Vol. 30, 471-476
- Tomaszewski, J. E.; Schwarzenbach, R.P.; Sander, M. (2011): Protein encapsulation by humic substances. *Environmental Science & Technology*, Vol. 45, 6003-6010
- Türk, O. (2014): Stoffliche Nutzung nachwachsender Rohstoffe. Springer Vieweg Verlag, Springer Fachmedien Wiesbaden
- Valldor, P.; Miethling-Graff, R.; Dockhorn, S.; Martens, R.; Tebbe, C.C. (2012): Production of the ¹⁴C-labeled insecticidal protein Cry1Ab for soil metabolic studies using a recombinant *Escherichia coli* in small-scale batch fermentations. *Applied Microbiology and Biotechnology* Vol. 96(1), 221-9
- Vallejo, L.F.; Rinas, U. (2004): Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. *Microbial Cell Factories*, Vol. 3(1), 11
- Van Loosdrecht, M.C.; Lyknema, J.; Norde, W.; Zehnder, A.B. (1990): Influence of interfaces on microbial activity. *Microbiology Reviews*, Vol. 54, 75-87
- Vance, E.; Brookes, P.; Jenkinson, D. (1987): An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biology and Biochemistry*, Vol. 19, 703-707
- Varma, A.; Abbott, L.; Werner, D.; Hampp, R. (2008): Plant surface microbiology. Springer Verlag, Berlin Heidelberg 2004, 2008

- Venkateswerlu, G.; Stotzky, G. (1992): Binding of the protoxin and toxin proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* on clay minerals. *Current Microbiology*, Vol. 25, 225-233
- Vettori, C.; Paffetti, D.; Saxena, D.; Stotzky, G.; Giannini, R. (2003): Persistence of toxins and cells of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* introduced in sprays to Sardinia soils. *Soil Biology and Biochemistry*, Vol. 35 (12), 1635-1642
- Vieublé Gonod, L.; Jones, D.L.; Chenu, C. (2006): Sorption regulates the fate of the amino acids lysine and leucine in soil aggregates. *European Journal of Soil Science*, Vol. 57, 320-329
- Vinolas, L.C.; Healey, J.R.; Jones, D.L. (2001): Kinetics of soil microbial uptake of free amino acids. *Biology and Fertility of Soils*, Vol. 33, 67-74
- Vogel, H. (1999): *Gerthsen Physik*, 20. Aufl., Springer-Verlag, Berlin
- Vogelgesang, J.; Hädrich, J. (1998): Limits of Detection, Identification and Determination: A Statistical Approach for Practitioners, Accreditation and Quality Assurance, Vol. 3, 242-255
- Walsh, G. (2005): Therapeutic insulins and their large-scale manufacture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 67(2), 151-159
- Wang, H.; Ye, Q.; Wang, W.; Wu, L.; Wu, W. (2006): Cry1Ab protein from *Bt* transgenic rice does not residue in rhizosphere soil. *Environmental Pollution*, Vol. 143, 449-455
- Wang, H.; Jay, Q.; Wu, L. (2007): Biodegradation of Cry1Ab protein from *Bt* transgenic rice on aerobic and flooded paddy soils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 55, 1900-1904
- Wang, H.Y.; Ye, Q.F.; Gan, J.; Wu, J.M. (2008): Adsorption of Cry1Ab protein isolated from *Bt* transgenic rice on bentone, kaolin, humic acids, and soils. *Journal of agricultural and food chemistry*, Vol. 56 (12), 4659-4664
- Weber, E.; Bleiholder, H. (1990): Erläuterungen zu den BBCH-Dezimal-Codes für die Entwicklungsstadien von Mais, Raps, Faba-Bohne, Sonnenblume und Erbse - mit Abbildungen. *Gesunde Pflanzen*, Vol. 42, 308-321
- West, A.W., and Burges, H.D. (1982): Ecology of *Bacillus thuringiensis* in the soil. In *Proceedings of the 3rd International Colloquium on Invertebrate Pathology*, 6-10 Sept. 1982, University of Sussex (Brighton), Society for Invertebrate Pathology, U.K., 319-232
- Worthington, C. (1991): *The Pesticide Manual*. British Crop Protection Council, Surrey
- Yu, H.L.; Li, Y.H.; Wu, K.M. (2011): Risk assessment and ecological effects of transgenic *Bacillus thuringiensis* crops on non-target organisms. *Journal of Integrative Plant Biology*, Vol. 53 (7), 520-538

Zhou, X.Y.; Huang, Q.Y.; Chen, S.W.; Yu, Z.N. (2005): Adsorption of the insecticidal protein of *Bacillus thuringiensis* on montmorillonite, kaolinite, silica, goethite and Red soil. *Applied Clay Science*, Vol. 30, 87-93

Zurbrügg, C.; Hönemann, L.; Meissle, M.; Romeis, J.; Nentwig, W. (2010): Decomposition dynamics and structural plant components of genetically modified Bt maize leaves do not differ from leaves of conventional hybrids. *Transgenic Research*, Vol. 19, 257-267

Zwahlen, C.; Hilbeck, A.; Gugerli, P.; Nentwig, W. (2003): Degradation of the Cry1Ab protein within transgenic *Bacillus thuringiensis* corn tissue in the field. *Molecular Ecology*, Vol. 12, 765-775

Quellen aus dem Internet:

Transgen (Stand 26.09.2014):

URL: http://www.transgen.de/anbau/flaechen_international/197.doku.html

Deutscher Wetterdienst (Stand 26.09.2014): Online frei abrufbare Klimadaten, Langjährige Mittelwerte für Temperatur, Niederschlag, Sonnenscheindauer für alle Stationen

URL: <http://www.dwd.de/>

bioSicherheit (Stand 26.09.2014):

URL: <http://www.biosicherheit.de/basisinfo/126.raffinierter-schaedling.html>

Bodengeologische Basiskarte (Stand 26.09.2014), Maßstab 1 : 50 000, Herausgeber: Landesamt für Bergbau, Geologie und Rohstoffe Brandenburg, in digitaler Form

URL: <http://www.geo.brandenburg.de/boden/>

10 Anhang

Anhang 1: Übersicht über Probenahmezeitpunkte, Art der Proben und Standortbezeichnungen für die Freilandstandorte	134
Anhang 2 : GPS-Koordinaten zu den Messpunkten an den Freilandstandorten	135
Anhang 3: Messdaten der Kontrollen zu den Cry1Ab-Gehalten in den Freilandböden während der Maisblüte (BBCH65)	137
Anhang 4: Messdaten der Kontrollen zu den Cry1Ab-Gehalten in den Freilandböden 4 - 6 Wochen nach der Ernte	138
Anhang 5: Summenkurven der $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzung sowie die zugehörigen Freisetzungsraten der weitergeführten Inkubationen während des ^{14}C -Cry1Ab-Abbaus über eine Dauer von 101 bzw. 136 Tagen in Ansatz A und B	139

Anhang 1: Übersicht über Probenahmezeitpunkte, Art der Proben und Standortbezeichnungen für die Freilandstandorte

Standorte	Feld- be- zeich- nung	Datum der Probenahme				
		Wurzelfreier Boden	Rhizosphärenboden	Frische Wurzeln	Alte Wurzeln	
Altreetz A	F12	14.06.05	-	-	14.06.05	
Altreetz B	F13	14.06.05	-	-	-	
Neureetz	F14	14.06.05	-	-	-	
Mädewitz	F15	14.06.05	-	-	-	
Alt Zeschdorf	F1	27.05.05	27.05.05	27.05.05	14.11.05 15.05.06 27.11.06	
		14.11.05				
		15.05.06				
		27.11.06				
Altlangsow	F2	27.07.05	27.07.05	27.07.05	-	
Groß Lüsewitz	F3 ⁽⁰⁵⁾ F3 ⁽⁰⁶⁾	29.08.05	29.08.05 19.12.05	29.08.05	19.12.05 22.05.06 15.08.06 28.11.06	
		19.12.05				
		22.05.06	15.08.06	15.08.06		
		15.08.06				
		28.11.06				
08.05.07						
Gusow	F4	27.07.05	27.07.05	27.07.05	14.11.05 08.05.06 27.11.06	
		14.11.05				
		08.05.06				
		27.11.06				
Wendhausen	F5 ⁽⁰⁵⁾ F5 ⁽⁰⁶⁾ F5 ⁽⁰⁷⁾	29.08.05	29.08.05 07.12.05	29.08.05	07.12.05 24.04.06 08.08.06 14.11.06 15.08.07 15.11.07	
		07.12.05				
		24.04.06	08.08.06 14.11.06	08.08.06		
		08.08.06				
		14.11.06	15.08.07 15.11.07	15.08.07		
		15.08.07				
		24.04.07				
		15.08.07				
15.11.07						
Mallnow	F6	14.08.06	14.08.06 13.11.06	14.08.06	13.11.06	
		13.11.06				
		07.05.07				
Altlangsow	F7	14.08.06 27.11.06 07.05.07	14.08.06 27.11.06	14.08.06	27.11.06	
Hohenstein	F8	14.08.06 13.11.06 07.05.07	14.08.06 13.11.06	14.08.06	13.11.06	
Groß Lüsewitz	F9	22.08.07 15.11.07	22.08.07 15.11.07	22.08.07	15.11.07	
Wulfen	F10	20.08.07 15.11.07	20.08.07 15.11.07	20.08.07	15.11.07	
Mügeln	F11	20.08.07 15.11.07	20.08.07 15.11.07	20.08.07	15.11.07	

Anhang 2 : GPS-Koordinaten zu den Messpunkten an den Freilandstandorten (Koordinatenbezugssystem WGS 84, angegeben in geografischen Koordinaten)

Standort	Bezeichnung	Messpunkt	Nördliche Breite / Östliche Länge
Alt Zeschdorf	F1	P1	52.425340 / 14.458606
		P2	52.427066 / 14.459738
		P3	52.428366 / 14.461309
		P4	52.425791 / 14.459712
		P5	52.424161 / 14.458799
Altlangsow	F2	P1	52.569463 / 14.424684
		P2	52.570382 / 14.424567
		P3	52.568736 / 14.440677
		P4	52.567773 / 14.441117
		P5	52.568960 / 14.432750
Groß Lüsewitz	F3 ⁽⁰⁵⁾ F3 ⁽⁰⁶⁾	P1	54.071064 / 12.319131
		P2	54.070692 / 12.319316
		P3	54.069645 / 12.319437
		P4	54.069695 / 12.320029
		P5	54.070698 / 12.319906
		P6	54.071094 / 12.319650
Gusow	F4	P1	52.586189 / 14.388804
		P2	52.585865 / 14.390842
		P3	52.585586 / 14.389163
		P4	52.585025 / 14.388792
		P5	52.585098 / 14.388112
Wendhausen	F5 ⁽⁰⁵⁾ F5 ⁽⁰⁶⁾ F5 ⁽⁰⁷⁾	P1	52.329148 / 10.629488
		P2	52.329589 / 10.629435
		P3	52.330037 / 10.629369
		P4	52.329489 / 10.630033
		P5	52.329939 / 10.629952
		P6	52.330372 / 10.629880
Mallnow	F6	P1	52.449442 / 14.505610
		P2	52.450894 / 14.506514
		P3	52.450426 / 14.504900
		P4	52.451491 / 14.504250
		P5	52.450280 / 14.503532
Altlangsow	F7	P1	52.569274 / 14.442310
		P2	52.570297 / 14.444886
		P3	52.568758 / 14.446527
		P4	52.569015 / 14.444453
		P5	52.567778 / 14.444012
Hohenstein	F8	P1	52.575181 / 13.964943
		P2	52.575596 / 13.967854
		P3	52.574724 / 13.968311
		P4	52.574919 / 13.966685
		P5	52.574282 / 13.965433
Groß Lüsewitz	F9	P1	54.068547 / 12.319753
		P2	54.068088 / 12.319801
		P3	54.068464 / 12.320165
		P4	54.068325 / 12.320870
		P5	54.068513 / 12.320823

**Anhang 2: (Fortsetzung) GPS-Koordinaten zu den Messpunkten an den Freilandstandorten
(Koordinatenbezugssystem WGS 84, angegeben in geografischen Koordinaten)**

Standort	Bezeichnung	Messpunkt	Nördliche Breite / Östliche Länge
Wulfen	F10	P1	51.817749 / 11.884310
		P2	51.817307 / 11.884193
		P3	51.817500 / 11.884663
		P4	51.817183 / 11.885001
		P5	51.817650 / 11.885165
Mügeln	F11	P1	51.850762 / 13.017810
		P2	51.850270 / 13.017729
		P3	51.850441 / 13.018188
		P4	51.850092 / 13.018486
		P5	51.850593 / 13.018598
Altreetz	F12	P1	52.753767 / 14.163999
		P2	52.753784 / 14.164504
		P3	52.753823 / 14.164924
		P4	52.753861 / 14.165614
		P5	52.754078 / 14.165597
		P6	52.754062 / 14.164930
		P7	52.753990 / 14.164453
		P8	52.753941 / 14.163936
Altreetz	F13	P1	52.753870 / 14.166480
		P2	52.753930 / 14.167560
		P3	52.753940 / 14.168740
		P4	52.754000 / 14.169970
		P5	52.754190 / 14.169990
		P6	52.754160 / 14.168740
		P7	52.754140 / 14.167850
		P8	52.754120 / 14.166880
Neureetz	F14	P1	52.785896 / 14.130370
		P2	52.786952 / 14.131818
		P3	52.788007 / 14.133045
		P4	52.789037 / 14.134367
		P5	52.788893 / 14.134552
		P6	52.787825 / 14.133192
		P7	52.786757 / 14.131897
		P8	52.785774 / 14.130524
Mädewitz	F15	P1	52.758619 / 14.177756
		P2	52.757487 / 14.176721
		P3	52.756236 / 14.175586
		P4	52.755079 / 14.174535
		P5	52.754909 / 14.174963
		P6	52.756082 / 14.176056
		P7	52.757274 / 14.177153
		P8	52.758439 / 14.178239

Anhang 3: Messdaten der Kontrollen zu den Cry1Ab-Gehalten in den Freilandböden während der Maisblüte (BBCH65)

Stand-ort	Mess-punkte	Datum	Cry1Ab-Gehalt im Boden [ng g ⁻¹]	Stand-ort	Mess-punkte	Datum	Cry1Ab-Gehalt im Boden [ng g ⁻¹]
F1	U1	27.07.05	0,00	F7	U1	14.08.06	0,00
	U2		0,00		U2		0,00
	U3		0,00		U3		0,00
	U4		0,00		U4		0,00
	U5		0,00		U5		0,00
F2	U1	27.07.05	0,00	F8	U1	14.08.06	0,00
	U2		0,00		U2		0,00
	U3		0,00		U3		0,00
	U4		0,00		U4		0,00
	U5		0,00		U5		0,00
F3 ⁽⁰⁵⁾	U1	29.08.05	0,00	F9	U1	22.08.07	0,00
	U2		0,00		U2		0,00
	U3		0,00		U3		0,00
	U4		0,00		U4		0,00
	U5		0,00		U5		0,00
F3 ⁽⁰⁶⁾	U1	15.08.06	0,00	F10	U1	20.08.07	0,00
	U2		0,00		U2		0,00
	U3		0,00		U3		0,00
	U4		0,00		U4		0,00
	U5		0,00		U5		0,00
F4	U1	27.07.05	0,00	F11	U1	20.08.07	0,00
	U2		0,00		U2		0,00
	U3		0,00		U3		0,00
	U4		0,00		U4		0,00
	U5		0,00		U5		0,00
F5 ⁽⁰⁵⁾	U1	29.08.05	0,00	F12	-	n.g.*	-
	U2		0,00				
	U3		0,00				
	U4		0,00				
	U5		0,00				
F5 ⁽⁰⁶⁾	U1	08.08.06	0,00	F13	-	n.g.*	-
	U2		0,00				
	U3		0,00				
	U4		0,00				
	U5		0,00				
F5 ⁽⁰⁷⁾	U1	15.08.07	0,00	F14	-	n.g.*	-
	U2		0,00				
	U3		0,00				
	U4		0,00				
	U5		0,00				
F6	U1	14.08.06	0,00	F15	-	n.g.*	-
	U2		0,00				
	U3		0,00				
	U4		0,00				
	U5		0,00				

*n.g. - nicht gemessen

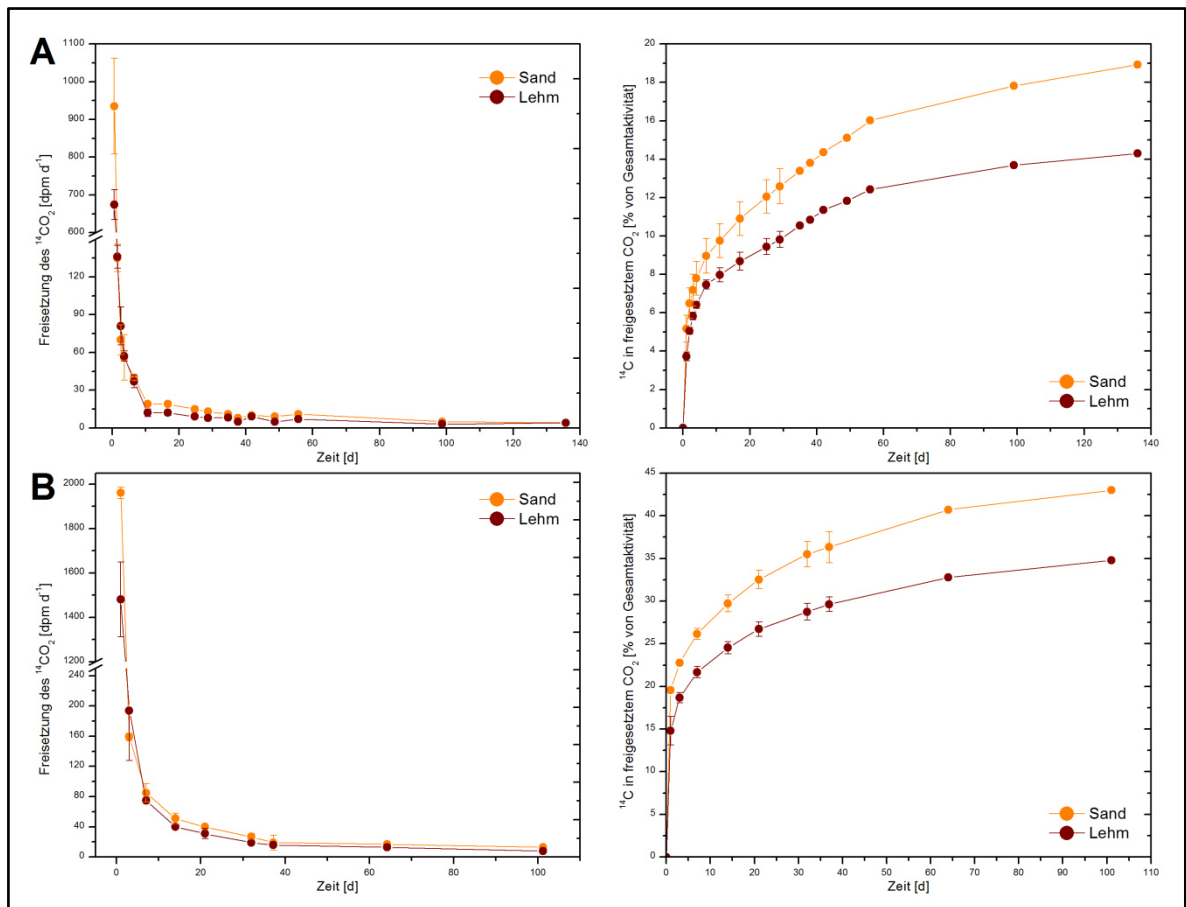
Anhang 4: Messdaten der Kontrollen zu den Cry1Ab-Gehalten in den Freilandböden 4 - 6 Wochen nach der Ernte

Stand-ort	Mess-punkte	Datum	Cry1Ab-Gehalt im Boden [ng g ⁻¹]
F1	U1	14.11.05	0,00
	U2		0,00
	U3		0,00
	U4		0,00
	U5		0,00
F2	U1	n.g.*	-
	U2		
	U3		
	U4		
	U5		
F3 ⁽⁰⁵⁾	U1	19.12.05	0,00
	U2		0,00
	U3		0,00
	U4		0,00
	U5		0,00
F3 ⁽⁰⁶⁾	U1	28.11.06	0,00
	U2		0,00
	U3		0,00
	U4		0,00
	U5		0,00
F4	U1	14.11.05	0,00
	U2		0,00
	U3		0,00
	U4		0,00
	U5		0,00
F5 ⁽⁰⁵⁾	U1	07.12.05	0,00
	U2		0,00
	U3		0,00
	U4		0,00
	U5		0,00
F5 ⁽⁰⁶⁾	U1	14.11.06	0,00
	U2		0,00
	U3		0,00
	U4		0,00
	U5		0,00
F5 ⁽⁰⁷⁾	U1	15.11.07	0,00
	U2		0,00
	U3		0,00
	U4		0,00
	U5		0,00
F6	U1	13.11.06	0,00
	U2		0,00
	U3		0,00
	U4		0,00
	U5		0,00

Stand-ort	Mess-punkte	Datum	Cry1Ab-Gehalt im Boden [ng g ⁻¹]
F7	U1	27.11.06	0,00
	U2		0,00
	U3		0,00
	U4		0,00
	U5		0,00
F8	U1	13.11.06	0,00
	U2		0,00
	U3		0,00
	U4		0,00
	U5		0,00
F9	U1	15.11.07	0,00
	U2		0,00
	U3		0,00
	U4		0,00
	U5		0,00
F10	U1	15.11.07	0,00
	U2		0,00
	U3		0,00
	U4		0,00
	U5		0,00
F11	U1	15.11.07	0,00
	U2		0,00
	U3		0,00
	U4		0,00
	U5		0,00
F12	U1	14.06.05	0,00
	U2		0,00
	U3		0,00
	U4		0,00
	U5		0,00
F13	U1	14.06.05	0,00
	U2		0,00
	U3		0,00
	U4		0,00
	U5		0,00
F14	U1	14.06.05	0,00
	U2		0,00
	U3		0,00
	U4		0,00
	U5		0,00
F15	U1	14.06.05	0,00
	U2		0,00
	U3		0,00
	U4		0,00
	U5		0,00

*n.g. - nicht gemessen

Anhang 5: Summenkurven der $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzung sowie die zugehörigen Freisetzungsraten der weitergeführten Inkubationen während des ^{14}C -Cry1Ab-Abbaus über eine Dauer von 101 bzw. 136 Tagen in Ansatz A und B



Danksagung

Die vorliegende Dissertation entstand am Institut für Biodiversität des Johann Heinrich von Thünen-Instituts in Braunschweig.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Christoph C. Tebbe der mir die Arbeiten an diesem Thema ermöglicht hat, für sein stetiges Interesse am erfolgreichen Fortgang dieser Arbeit, für die Möglichkeit zu einem freien und selbständigen Arbeiten, für seine ständige Diskussionsbereitschaft und die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Bei Herrn Prof. Dr. Robert Kreuzig und Herrn Prof. Dr. Rolf Nieder bedanke ich mich für die bereitwillige Übernahme der Koreferate.

Frau Dr. Rona Miethling-Graff und Frau Dr. Susanne Dockhorn danke ich für die ständige Diskussionsbereitschaft, Motivation und Unterstützung während der Arbeit sowie für die Einführung in die Methodik der Proteinsynthese und für die Hilfe bei der statistischen Datenauswertung der SSCP-Profile.

Herrn Dr. Rainer Martens danke ich für die hilfreichen Ratschläge zur ^{14}C -Messung des Proteinabbaus und ebenfalls für die fortwährende Bereitschaft meine Fragen zu beantworten.

Frau Dr. Hang Nguyen Thu vom DLR Rheinland-Pfalz in Neustadt an der Weinstraße danke ich für die telefonische Unterstützung bei technischen Problemen während der Synthese des Cry1Ab im Labor.

Frau Dr. Anja Dohrmann danke ich ebenfalls für die ständige Bereitschaft alle Fragen die während der experimentellen Arbeit auftraten zu beantworten.

Kathrin Ahrens, Britta Müller und Carsten Bitzer danke ich für die zuverlässige Unterstützung bei allen Arbeiten und Analysen im Labor und besonders auch für ihr Durchhaltevermögen bei den anstrengenden Probenahmen im Maisfeld. Ein besonderer Dank geht hier auch an Harry Schmelzer, der uns tatkräftig bei den Probenahmen unterstützt hat.

Ich danke allen Landwirten für Ihre Kooperationsbereitschaft und die Erlaubnis auf ihren Maisfeldern Probenahmen durchzuführen.

Allen Mitgliedern der AG-Tebbe und allen anderen Kollegen im Institut danke ich für das angenehme Arbeitsklima.

Ich danke Herrn Dr. Jens Schulze für seine Hilfsbereitschaft und Diskussionsfreude.

Vor allem danke ich meinem Mann Martin Valldor, der mit seiner Unterstützung und stetiger Motivation wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat. Nicht zu vergessen seien meine Kinder, Carolina und Aaron, die mich jeden Tag an Ihrer Lebensfreude teilhaben lassen.

Diese Arbeit wurde als Teilprojekt im Rahmen des Verbundprojekts „Freisetzungsbegleitende Sicherheitsforschung bei transgenem *Diabrotica*-resistenten BT-Mais: Entwicklung und Validierung von Monitoringmethoden“ vom BMBF gefördert. Die Arbeit beschäftigte sich jedoch nicht mit *Diabrotica*-resistentem Mais mit Cry3Bb1-Protein, sondern mit dem MON810-BT-Mais mit dem Protein Cry1Ab.

Danke.